

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Psychiatrie und Psychotherapie
Klinikum Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

Das Grin-1-Gen in der Schizophrenie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Julian Markus Kalasch

aus
München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: PD Dr. med. E. Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2007

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Definition der Schizophrenie	3
2.2 Historische Aspekte	3
2.3 Klassifikation schizophrener Psychosen	4
2.4 Krankheitsverlauf	5
2.5 Epidemiologie	6
2.6 Äthiologie	6
2.6.1 Schwangerschaftskomplikationen	7
2.6.2 Geburtskomplikationen.....	8
2.6.3 Autoimmunerkrankungen	8
2.6.4 Morphologische Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie	8
2.6.5 Genetische Faktoren	10
2.6.6 Kopplungsanalysen	11
2.6.7 Assoziationsstudien.....	13
2.6.8 Dopaminhypothese.....	13
2.6.9 Glutamathypothese	14
2.6.9.1 Gene des glutamatergen Systems.....	14
2.6.9.1.1 Neuregulin1.....	14
2.6.9.1.2 DTNBP1 (Dysbindin)	15
2.6.9.1.3 G72 und DAAO	15
2.6.9.1.4 Gene des NMDA-Rezeptors (NMDAR).....	16
2.6.9.2 Pharmakologisch induzierte schizophrene Psychosen mittels NMDAR-Antagonisten.....	17
2.6.9.3 Auswirkungen einer NMDA-Rezeptor Hypofunktion im Tierversuch.....	18
2.7 Glutamat-Rezeptoren.....	19
2.7.1 NMDA-Rezeptor	19
2.7.1.1 Aufbau und Funktion.....	20
2.7.1.2 Expression der verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors....	22
2.7.1.3 Einfluss der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten auf dessen Eigenschaften	23
2.7.1.4 NR1-Untereinheit	24
2.7.1.4.1 Aufbau der NR1-Untereinheit	24

2.7.1.5 Intrazelluläre Vorgänge nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung	26
2.7.1.6 Einfluss des NMDAR auf die Hirnentwicklung.....	28
2.7.1.7 Einfluss des NMDAR auf die Neuroplastizität	30
2.7.1.8 NMDAR-Hypofunktion und Neurotoxizität.....	31
2.7.1.9 Veränderungen des NMDAR bei Schizophrenie	33
2.8 Genetische Variationen des Grin 1 Gens.....	35
2.8.1 Auswahl der SNPs.....	35
3 Fragestellung.....	37
4 Material und Methoden.....	38
4.1 Material	38
4.1.1 Geräte	38
4.1.2 Software	39
4.1.3 Chemikalien.....	39
4.1.4 Oligonukleotide.....	40
4.1.5 Polymorphismen.....	40
4.2 Methoden	41
4.2.1 Studienteilnehmer.....	41
4.2.1.1 Kontrollgruppe.....	41
4.2.1.2 Schizophrene Patienten	42
4.2.1.3 DNA-Extraktion	42
4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung	43
4.2.3 Polymerase Kettenreaktion	44
4.2.4 Reagenzien für die PCR.....	46
4.2.4.1 DNA-Polymerase	46
4.2.4.2 Primer	46
4.2.4.3 Desoxynukleotide.....	47
4.2.4.4 Puffer	47
4.2.5 PCR Optimierung.....	47
4.2.5.1 Puffer-Optimierung.....	47
4.2.5.2 Annealing-Temperatur	48
4.2.5.3 Zyklen-Optimierung.....	49
4.2.6 Verdau der PCR-Produkte.....	49
4.2.7 Agarose Gelelektrophorese	49
4.3. Die Auswertung der untersuchten Polymorphismen	51

4.3.1 Der –855G/C Polymorphismus in der 5`UTR des Grin1-Gens	51
4.3.1.1 BseRI-Verdau	52
4.3.2 Der 17438 G/A Polymorphismus des Exon7 des Grin1-Gens	54
4.3.2.1 BtgI-Verdau.....	54
4.4 Statische Auswertung	57
5 Ergebnisse.....	58
5.1 Analyse des -855 G/C Polymorphismus der 5`UTR des Grin1-Gens.....	58
5.1.1 Analyse der 5`UTR-Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe	58
5.1.2 Analyse der 5`UTR-Genotypverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.....	59
5.2 Analyse des 17438 G/A Polymorphismus des Exon 7 des Grin1-Gens	61
5.2.1 Analyse der Exon7-Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.	61
5.2.2 Analyse der Exon7-Genotypverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.....	62
6 Diskussion	64
6.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse.....	64
6.1.1 Funktionelle Relevanz der untersuchten Polymorphismen des Grin1-Gens..	64
6.1.2 Möglicher Einfluß des C-Allels des –855G/C Polymorphismus der 5`UTR des Grin1-Gens auf die Funktion des NMDA-Rezeptors	66
6.2 Referenzstudien.....	67
6.2.1 Studie von Sakurai et al. 2000.....	67
6.2.2 Studie von Rice et al. 2001.....	67
6.2.3 Studie von Hung et al. 2002 an einer taiwanesischen Population	68
6.2.4 Studie von Williams et al. 2002 in Großbritannien	68
6.2.5 Studie von Begni et al. 2003 an einer italienischen Population	69
6.2.6 Studie von Martucci et al. 2003 an einer kanadischen Population	69
6.2.7 Studie von Tani et al. 2002 an einer japanischen Population	70
6.2.8 Studie von Paus et al. 2004 an einer deutschen Population	70
6.2.9 Studie von Qin et al. 2005 an einer chinesischen Population.....	71
6.2.10 Studie von Zhao et al. 2006 an einer chinesischen Population	72
6.3 Abschließende Beurteilung der untersuchten Einzelmarker im Kontext der Literatur.....	73
6.3.1 Ätiologische Heterogenität der Erkrankung	74
6.3.2 Ethnische Abstammung.....	75

6.3.3 Studiendesign.....	76
6.3.4 Gen-Gen Interaktionen.....	78
6.4 Ausblick.....	79
7 Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis.....	82
8 Literaturverzeichnis	85
9 Danksagung	114
10 Lebenslauf.....	115

1 Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen verbunden mit massiven Auswirkungen auf die Lebensqualität, die Erlebnisfähigkeit und die Leistungsfähigkeit der Betroffenen. Die Erkrankung weist eine Prävalenz von 0,5-1% auf, und ist in allen Ethnitäten und Kulturen anzutreffen.

Die genaue Ätiologie der Schizophrenie ist noch immer ungeklärt. Nach dem derzeitigen Wissensstand wird eine Beteiligung mehrerer Gene und deren Interaktion mit Umweltfaktoren angenommen.

Mit Hilfe von Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien konnten bisher zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Grin1-Gen ist ein funktionelles Kandidatengen, lokalisiert auf Chromosom 9q34.3, das in mehreren Assoziationsstudien als Risikogen für Schizophrenie identifiziert wurde. Dieses Gen codiert für die essentielle NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Dieser ist zentraler Bestandteil des glutamatergen Systems und beteiligt an der neuronalen Entwicklung, der Neuroplastizität und neurotoxischen Vorgängen.

In zahlreichen Studien konnte demonstriert werden, dass eine pharmakologisch induzierte NMDA Rezeptor Hypofunktion mittels nicht-kompetitiver Antagonisten wie PCP oder MK-801 sowohl die Positiv- als auch die Negativsymptomatik der Schizophrenie hervorrufen kann. Im Thalamus, im Kortex und zahlreichen anderen Strukturen des ZNS konnten außerdem bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollen veränderte Konzentrationen der verschiedenen Untereinheiten des NMDA Rezeptors beobachtet werden.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass das Grin1-Gen an der Pathologie der Schizophrenie beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden 2 Basenaustauschpolymorphismen innerhalb des Grin1-Gens in einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie auf eine Assoziation mit der Erkrankung hin untersucht. Für den SNP -855 G/C der 5'UTR liegen bereits 2 positive Assoziationsergebnisse vor. Auch scheint dieser Einzelmarker über eine Veränderung der Konsensussequenz des Transkriptionsfaktors NF-kappa-B einen Einfluss auf die Expression der NR1-Untereinheit auszuüben (Begni et al. 2003). Der andere untersuchte SNP 17438G/A ist im Exon 7 des Grin1-Gens lokalisiert.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen des Grin1-Gens mit der Diagnose Schizophrenie ermittelt werden. Die zweifelsfreie Klärung einer Beteiligung des Grin1-Gens an der Pathogenese der Schizophrenie bedarf weiterer unabhängiger Studien. In zukünftigen Untersuchungen muss darauf geachtet werden, eine möglichst große Anzahl an Polymorphismen über das gesamte Gen hinweg zu untersuchen. Auch deuten erste Ergebnisse von Gen-Gen-Interaktionsstudien darauf hin, dass die einzelnen Kandidatengene nicht miteinander konkurrieren, sondern eher ein Zusammenspiel derselben besteht (Qin et al. 2005).

2 Einleitung

2.1 Definition der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine psychische Erkrankung, die den endogenen Psychosen zugeordnet wird. Charakteristisch ist ihre sowohl symptomatische als auch neuropathologische Heterogenität. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Veränderungen des Denkens und der Wahrnehmung, durch Affekt- und Antriebsstörungen, durch Ich-Störungen und durch einen Verlust sozialer Kompetenzen, ohne dass dabei die intellektuellen Fähigkeiten des Betroffenen eingeschränkt werden.

2.2 Historische Aspekte

Der deutsche Psychiater Emil Kraepelin beschrieb 1896 das Störungsbild der Schizophrenie, das er unter dem Begriff „Dementia praecox“ zusammenfasste. Je nach Verlauf und vorherrschender Symptomatik kann die hebephrene, katatone oder paranoid-halluzinatorische Schizophrenie vorliegen (Diefendorf 1902; Kraepelin 1896). Für Kraepelin handelte es sich um eine Gesamtveränderung der Persönlichkeit, in der vor allem die Willensfunktion beeinträchtigt ist und die durch eine fortschreitende Verschlechterung gekennzeichnet ist.

Bleuler führte 1911 den Begriff Schizophrenie (Bewusstseinsspaltung) ein und leitete diagnostische Kriterien aus einem theoretischen Konzept über die Art des pathologischen Prozesses bei dieser Störung ab. Er unterschied zwischen primären und sekundären Störungen. Die primären Störungen sah er als eine direkte Folge eines zerebralen Prozesses (lockere Assoziationen, Bewusstseinstörungen und Schwankungen der Stimmungslage) an. Die sekundären Störungen (Wahn, Ambivalenz, Autismus, Negativismus) wertete er als Ergebnis des Versuchs, sich an primäre Störungen anzupassen.

Kurt Schneider entwickelte in den 50er Jahren die Lehre von den Symptomen ersten und zweiten Ranges. Diese Lehre stellte den Versuch dar, die Symptome nach der Bedeutung für die Diagnose einzuteilen. Wahnwahrnehmung, Gedankenentzug, Gedankeneingebung, Gedankenlautwerden und andere Beeinflussungserlebnisse

zählte er zu den Symptomen ersten Ranges. Affektveränderungen, Wahneinfälle und sonstige Halluzinationen ordnete er den Symptomen zweiten Ranges zu.

Seit den 70er Jahren erfolgt eine Unterscheidung von Positiv- und Negativsymptomatik. Zu den positiven Symptomen zählen Wahn, formale Denkstörungen, Halluzinationen sowie desorganisiertes Verhalten. Affektverarmung, sozialer Rückzug, Alogie und Aufmerksamkeitsstörungen werden den negativen Symptomen zugeordnet (Andreasen und Olsen 1982; Crow 1980).

2.3 Klassifikation schizophrener Psychosen

Derzeit werden für die Diagnose der Schizophrenie die Kriterien des von der WHO konzipierten International Classification of Diseases, 10. Fassung (ICD 10) und des von der American Psychiatric Association herausgegebenen Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition (DSM IV) herangezogen. Die Diagnosestellung erfolgt bei beiden Systemen durch die Erfüllung einer Mindestzahl definierter diagnostischer Kriterien und nicht durch das Vorhandensein eines Einzelsymptoms.

Nach der ICD-10-Klassifikation werden die schizophrenen Psychosen in sieben Subtypen klassifiziert. Zu diesen gehören die paranoide, hebephrene, katatone und undifferenzierte Schizophrenie, die postschizophrene Depression, das schizophrene Residuum und die Schizophrenia Simplex. Die Klassifikation des Diagnosesystems DSM-IV unterscheidet fünf Haupttypen: den paranoiden, desorganisierten, katatonen, undifferenzierten und residualen Typus (Möller und Deister 2000).

Beide Systeme unterscheiden sich, neben der abweichenden Bezeichnung ähnlich definierter Subtypen, auch in der Dauer geforderter schizophrener Symptome. Im ICD 10 wird beispielsweise eine Dauer der Symptomatik von einem Monat, im DSM IV ein kontinuierlicher Erkrankungszeitraum von mindestens sechs Monaten verlangt.

2.4 Krankheitsverlauf

Mehrere Jahre vor dem Ausbruch charakteristischer Symptome, durchleben etwa ein Drittel der Betroffenen ein Prodromalstadium (Marneros et al. 1991). Dieses ist häufig gekennzeichnet durch eine depressive Stimmung sowie einer Minderung der Leistungsfähigkeit einhergehend mit Unruhe und Gespanntheit.

Auf der anderen Seite gibt es auch Patienten, die einen akuten Erkrankungsbeginn innerhalb weniger Tage bis Wochen zeigen.

Zu Beginn einer schizophrenen Erkrankung dominieren bei etwa 70% der Patienten negative Symptome, bei 10% stehen die positiven Symptome im Vordergrund und 20% der Patienten zeigen beide (Maurer und Häfner 1995). Der am häufigsten diagnostizierte Subtyp der ersten Krankheitsepisode ist die paranoid-halluzinatorische Schizophrenie (Deister und Marneros 1993). Die akute Erkrankungsphase dauert in der Regel ein bis drei Monate. Nach einer akuten Psychose können postpsychotische Depressionen auftreten.

Im langjährigen Krankheitsverlauf durchleben über 90% der Patienten mehr als eine abgrenzbare Krankheitsepisode (Marneros et al. 1991).

Die Ergebnisse der Studien über den Langzeitverlauf schizophrener Psychosen variieren stark. Der Anteil an Patienten mit eher günstigem Krankheitsausgang schwankt von 0-50%. In einer aktuellen Studie, bei der schizoaffective Psychosen nicht mit berücksichtigt wurden, fand sich bei 148 Patienten nach einem durchschnittlichen Krankheitsverlauf von 25 Jahren nur bei 7% eine psychopathologische Symptommfreiheit. 48,6% der Studienteilnehmer zeigten eine anhaltende Negativ-Symptomatik. Bei 34,4% bestanden sowohl positive als auch negative Symptome und bei 7% fanden sich lediglich positive Symptome (Marneros et al. 1991).

Die Prognose hängt von mehreren Parametern, wie allgemeinen, sozialen und psychopathologischen Faktoren ab. Auch Verlaufsaspekte spielen eine Rolle. Eine eher günstige Prognose ist beispielsweise bei weiblichen Patienten, bei Vorliegen des paranoiden Subtyps, bei guter prämorbid sozialer Anpassung und akutem Krankheitsbeginn zu erwarten.

2.5 Epidemiologie

Die Krankheitshäufigkeit der Schizophrenie, auch als Prävalenz bezeichnet, wird mit 0,5-1% angegeben (Häfner 1995). Die Inzidenz, d.h. die jährliche Zahl der Neuerkrankten liegt bei 0,05%.

Männer und Frauen sind von der Erkrankung etwa gleich häufig betroffen (Jablensky und Cole 1997). Hinsichtlich der Prävalenzzahlen bestehen in den verschiedenen Ethnitäten und Kulturen kaum Unterschiede (Häfner 1993b; Tsuang et al. 1995).

Die erstmalige Manifestation der Erkrankung erfolgt bei der Mehrzahl der Patienten zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr. Das durchschnittliche Alter der Ersterkrankung liegt bei Frauen etwa 5 Jahre später als bei Männern (Häfner et al. 1991; Jablensky und Cole 1997). Bei Erstmanifestationen nach dem 40. Lebensjahr liegt eine Spät- und bei Erstmanifestation nach dem 60. Lebensjahr eine Altersschizophrenie vor.

2.6 Ätiologie

Die genaue Ätiologie der Schizophrenie ist trotz intensiver Forschung noch immer ungeklärt.

Als gesicherte Risikofaktoren gelten eine familiäre Belastung, pränatale und perinatale Geburts- und Schwangerschaftskomplikationen, Infektionen während der Schwangerschaft und der Kindheit, Drogenabusus sowie das Aufwachsen in Großstädten. Nach dem derzeitigen Wissensstand handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Man konnte bislang lediglich ausschließen, dass die Schizophrenie einem bekannten monogenen Erbgang folgt. Vielmehr scheint kausal eine Beteiligung mehrerer Gene und deren Interaktion mit nicht-genetischen Umweltfaktoren vorzuliegen (Maier et al. 1999).

2.6.1 Schwangerschaftskomplikationen

Die Beobachtung einer überdurchschnittlich häufigen Geburt von Patienten mit Schizophrenie in den Wintermonaten (Torrey und Bowler 1990) führte zu der Überlegung, ob dieses Phänomen möglicherweise in Zusammenhang mit Umweltfaktoren, wie Virusinfektionen der Mutter in einer vulnerablen Phase der Schwangerschaft steht.

Es wird angenommen, dass die Reaktion des mütterlichen Immunsystems auf eine virale Infektion während der Gravidität die Bildung entscheidender neuronaler Strukturen des fetalen Gehirns stört. Resultat dieser Vorgänge sind neurophysiologische Abweichungen, die das Risiko einer späteren schizophrenen Psychose erhöhen.

Die meisten Ergebnisse liegen zum Influenzavirus vor, der erstmals 1928 von Menninger, der die Überlebenden der „spanischen Grippe“ von 1918 untersuchte, mit Schizophrenie in Verbindung gebracht wurde.

In mehreren Studien konnte eine Assoziation zwischen einer maternalen Influenzainfektion während des 2. Trimenons und Schizophrenie nachgewiesen werden (Watson et al. 1984; Mednick et al. 1988; O`Callaghan et al. 1991; Izumoto et al. 1999; Limosin 2003). Diese Ergebnisse konnten jedoch von anderen Studien nicht bestätigt werden (Kendell et al. 1989; Cannon et al. 1996; Selten et al. 1994; Mino et al. 2000).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist die Gruppe der Herpes-Viren. Die Herpes-Simplex- Viren 1 und 2, der Varicella Zoster Virus sowie der Zytomegalievirus wurden bereits mit der Pathogenese der Schizophrenie assoziiert (Watson et al. 1984; Dickerson et al. 2003; Leweke et al. 2004; Buka et al. 2001; Yolken 2004).

Bei Schizophrenen mit einer nachgewiesenen CMV-Infektion bewirkte eine antivirale Therapie mit Valacyclovir eine Reduktion der Krankheitssymptome (Dickerson et al. 2003). Iwahashi et al konnten zeigen, dass Schizophreniepatienten signifikant häufiger Borna-Virus Antikörper aufweisen als Kontrollpersonen (Iwahashi et al. 1997). Nachfolgende Studien konnten diese Resultate bestätigen (Isoshima et al. 1998; Ferszt et al. 1999).

2.6.2 Geburtskomplikationen

In der Vorgeschichte schizophrener Patienten sind häufiger Ereignisse wie Frühgeburt, Inkubatorbehandlung, eine Rhesusfaktor-Inkompabilität, Präeklampsie, Sectio caesarea, Geburtsstillstände, Nabelschnurkomplikationen, niedriges Geburtsgewicht verlängerte Geburtsdauer oder Asphyxie zu finden (Parnas et al. 1982; McNeil 1987; Lewis und Murray 1987; Owen et al. 1988; O'Callaghan et al. 1992; Kunugi et al. 2001; Dalman et al. 1999; Dalman et al. 2001; Boog 2004).

Diese Komplikationen können eine perinatale Hypoxie oder Ischämie mit der Folge einer Sauerstoffunterversorgung im Körper verursachen.

Insbesondere beim Zusammentreffen mehrerer dieser Faktoren ist das Risiko der späteren Entwicklung einer Schizophrenie scheinbar erhöht (Cannon et al. 1999).

2.6.3 Autoimmunerkrankungen

Von manchen Autoren werden Autoimmunerkrankungen wie der Lupus erythematoses oder die Slerodermie als Ursache vermutet (De Lisi et al. 1987; Brixey et al. 1993). Wright et al konnten in einer Studie zeigen, dass 50% der Schizophreniepatienten an Autoimmunerkrankungen leiden oder Autoantikörper besitzen (Wright et al. 1999). Man nimmt an, dass der Körper postnatal zirkulierende Antikörper produziert, die gegen hirnspezifische Proteine gerichtet sind und deshalb eine Gehirndysfunktion nach sich ziehen. Antikörper gegen die Septumregion konnten beispielsweise bei Schizophreniepatienten nachgewiesen werden (Heath et al. 1989; Schott et al. 1999).

2.6.4 Morphologische Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie

Die Suche nach makroskopischen Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie wurde bereits von Emil Kraepelin forciert, der die These vertrat, dass diesem Krankheitsbild eine hirnmorphologische Grundlage zuzuschreiben sei. Bereits 1897 publizierte sein Mitarbeiter Alzheimer eine der ersten Arbeiten, die qualitative Veränderungen im Bereich des Neocortex bei schizophrenen Patienten beschrieb. In den folgenden Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere Arbeiten zur Neuropathologie der Schizophrenie publiziert. Eindeutige Beweise für histomorphologische

Einleitung

Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie konnten lange Zeit nicht erbracht werden, da geeignete bildgebende Verfahren fehlten. Die üblicherweise mit dem Lichtmikroskop ausgewerteten post-mortem-Befunde konnten lange nicht ausreichend valide systematisch quantifiziert werden.

Die erste computertomographische Untersuchung schizophrener Patienten durch Johnstone et al. 1976 zeigte eine Erweiterung der inneren Liquorräume (Johnstone et al. 1976). In Folgestudien konnte eine Ventrikelerweiterung, insbesondere der Temporalhörner bestätigt werden (Raz und Raz 1990; Lawrie und Abukmeil 1998; Wright et al. 2000). Eine weitere eingehend untersuchte Struktur ist der Temporallappen, bei dem in 70% aller Studien eine Volumenabnahme festgestellt werden konnte. Diese ist jedoch nicht homogen über den gesamten Temporallappen verteilt, sondern betrifft spezifische Substrukturen (McCarley et al. 1999; Wright et al. 2000).

Volumenminderungen im anterioren Gyrus temporalis superior korrelierten mit akustischen Halluzinationen (Levithan et al. 1999; Rajarethinam et al. 2000).

Menon et al konnten zeigen, dass ein Verlust an grauer Substanz dieser Region sich auch auf die allgemeine Positivsymptomatik auswirkt (Menon et al. 1995; Jacobsen et al. 1998).

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass eine Volumenreduktion im Planum temporale mit formalen Denkstörungen assoziiert ist (Menon et al. 1995).

Auch für subkortikale Strukturen, wie den Thalamus, die Basalganglien oder das Cerebellum konnten Veränderungen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse konnten jedoch zum Teil nicht repliziert werden, oder stehen im Widerspruch zueinander.

Bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die beobachteten Ventrikelerweiterungen und Volumenminderungen das Resultat einer Hirnentwicklungsstörung oder einer progredienten Neurodegeneration sind.

Einige Studien stützen die These einer Entwicklungsstörung (Ho et al. 2003; James et al. 2002; Colombo et al. 1993). Andere Studienergebnisse deuten jedoch auf eine Neurodegeneration hin (Cahn et al. 2002; Thompson et al. 2001; Woods et al. 1998). Zunehmend wird die These vertreten, dass beide Ansätze einander nicht ausschließen, sondern als komplementär gelten können.

2.6.5 Genetische Faktoren

Erste Erkenntnisse zur Heritabilität schizophrener Erkrankungen konnten bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts aufgezeigt werden (Rüdin 1916). Systematische Familien-, Zwillings-, und Adoptionsstudien lieferten weitere Hinweise auf die Beteiligung von genetischen Faktoren (Cardno et al. 1999; Tsuang et al. 2001; Cloninger 2002; Gottesmann 2001).

In Familienuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Erkrankungsrisiko sowohl mit dem Verwandtschaftsgrad, als auch mit dem Schweregrad der Erkrankung des betroffenen Familienmitglieds korreliert (McGuffin et al. 1995).

Das Risiko, eine Schizophrenie zu entwickeln liegt bei Kindern schizophrener Eltern (ein Elternteil erkrankt) bei etwa 13%, wohingegen die Prävalenzrate in der Allgemeinbevölkerung nur 1% beträgt. Bei Enkelkindern ist das Erkrankungsrisiko immerhin noch um den Faktor drei erhöht (Häfner 1995; Tsuang et al. 2001; Gottesmann 2001).

Die Ergebnisse von Zwillingsstudien (Gottesmann 2001; Cannon et al. 1998; Franzek und Beckmann 1996; Onstad et al. 1991) bestätigen eine starke genetische Rolle bei der Schizophrenieentstehung. In verschiedenen Studien konnte bei genetisch identischen eineiigen Zwillingen eine Konkordanzrate von 40-60% festgestellt werden. Bei dizygoten Zwillingen, die nur etwa 50% ihrer Gene teilen, lag diese dagegen nur bei 4-17% (Gottesmann 2001; Cannon et al. 1998; Franzek und Beckmann 1996; Onstad et al. 1991). Aus der durchschnittlich etwa 50%igen Konkordanz für Schizophrenie bei monozygoten Zwillingen wird aber auch der Beitrag nichtgenetischer Faktoren ersichtlich.

Adoptionsstudien liefern weitere Hinweise auf eine genetisch bedingte Determination der Erkrankung. Kinder mit familiärer Vorbelastung behielten das erhöhte Erkrankungsrisiko auch in einer nicht mit Schizophrenie belasteten Adoptivfamilie bei. Andererseits erhöhte sich das Erkrankungsrisiko von Adoptivkindern, die in Familien mit schizophrenerkrankten Eltern vermittelt wurden, nicht (Kendler et al. 1994; Kety et al. 1994).

All diese Ergebnisse deuten auf eine genetische Prädisposition hin. Der detaillierte molekulargenetische Mechanismus ist jedoch noch immer unklar. Nach dem derzeitigen Wissensstand konnte ein monogener Erbgang ausgeschlossen werden.

Vielmehr scheint kausal eine Beteiligung mehrerer Gene und deren Interaktion mit nicht-genetischen Umweltfaktoren vorzuliegen (Maier et al. 1999).

Ziel ist es, mittels Kopplungs- und Assoziationsstudien einzelne Gene, die an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind, zu identifizieren.

2.6.6 Kopplungsanalysen

Ziel von Kopplungsanalysen ist der Nachweis der gemeinsamen Vererbung einer Krankheit mit einem polymorphen Marker innerhalb einer Familie. Die erforderliche Stichprobe sind Familien mit zwei oder mehr erkrankten Mitgliedern. Dabei muss es sich nicht um Großfamilien handeln, wie sie bei monogenen Erbkrankheiten von Vorteil sind, vielmehr eignen sich für Kopplungsanalysen komplexer Krankheiten vor allem erkrankte Geschwister-Paare, da sich bei diesen sogenannten Kernfamilien eher Homogenität für genetische Faktoren annehmen lässt (Maier et al. 1999).

Die Verwendung von genetischen Variationen (z.B. Polymorphismen) mit bekannter chromosomaler Lokalisation ermöglicht es nun, Hinweise auf die Lage der mit der Erkrankung assoziierten Gene zu erhalten. Bei Verwendung einer ausreichend grossen Anzahl von Markern lässt sich so das gesamte Genom abdecken. Eine genaue Identifizierung der Risikogene gestaltet sich jedoch schwierig, da die so ermittelten Kandidatenregionen sich über 10 bis 30 Centimorgan (cM) erstrecken.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden signifikante Kopplungen mit Schizophrenie für zahlreiche chromosomale Regionen publiziert. Es konnten jedoch nur sehr wenige Ergebnisse repliziert werden (Moldin 1997). Ursächlich hierfür ist unter anderem eine oft zu kleine Stichprobenzahl (Owen et al. 2000).

In den letzten Jahren wurden mehrere Genom-Scans durchgeführt, bei denen systematisch das gesamte menschliche Genom auf das Vorliegen einer Kopplung hin untersucht wurde. Zwei aktuelle Metaanalysen, die von Lewis et al. und Badner et al. durchgeführt wurden, versuchen die wichtigsten Kopplungssignale herauszufinden und darzustellen (Abb 1) (Badner et al. 2002; Lewis et al. 2003).

Einleitung

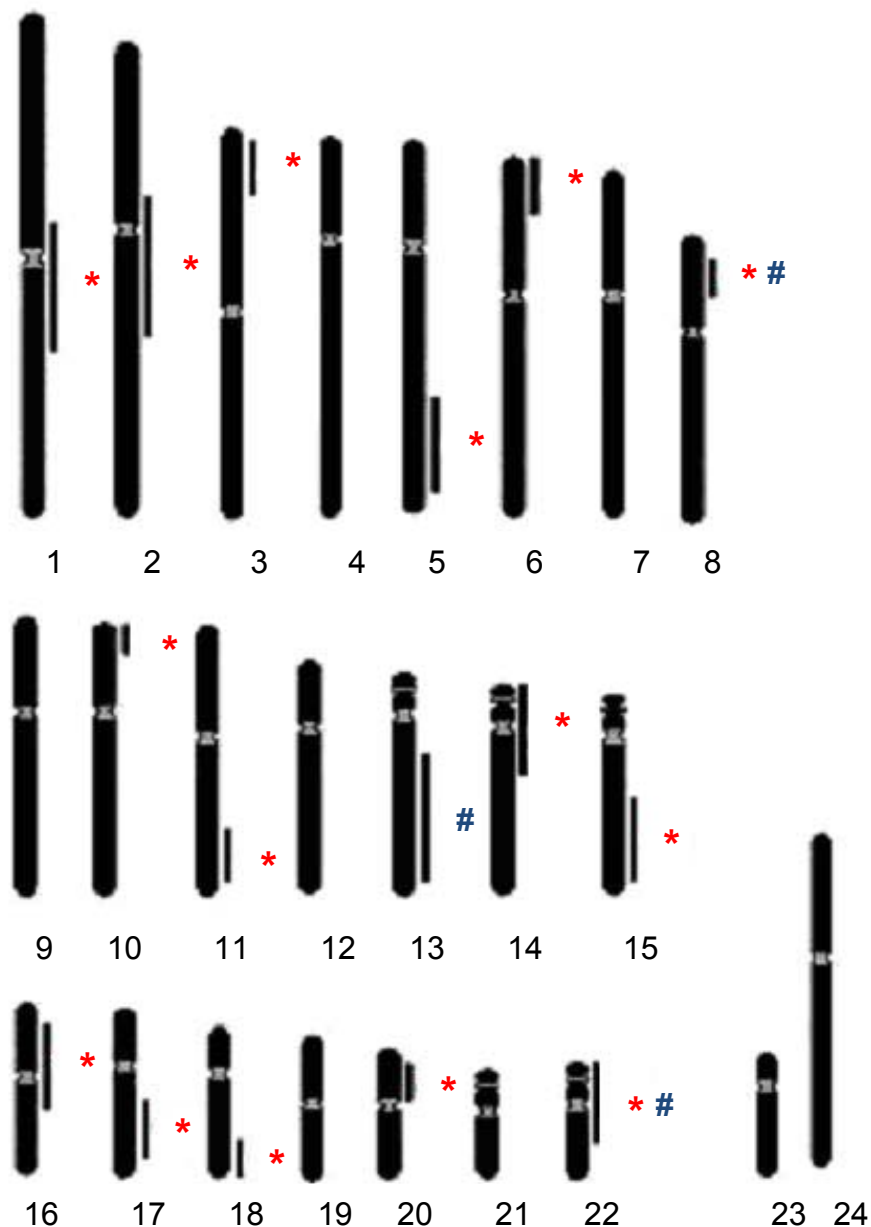


Abb.1 Ergebnisse der Metaanalysen von Lewis et al. und von Bandner et al.

Die mit einem * gekennzeichneten Chromosomen zeigen Regionen, in denen in der Metaanalyse von Lewis et al. signifikante Kopplungsergebnisse gefunden wurden. Die Ergebnisse der Metaanalyse von Bandner et al sind mit einer # gekennzeichnet.

Obwohl die derzeitige Datenlage darauf hindeutet, dass multiple genetische Loci bei der Pathogenese der Schizophrenie eine Rolle spielen, konnte die Suche nach positionellen Kandidatengenen bereits deutlich eingegrenzt werden.

2.6.7 Assoziationsstudien

In Assoziationsstudien wird überprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele eines Polymorphismus in Stichproben aus nicht verwandten Erkrankten im Vergleich mit Kontrollpersonen besteht.

Bei der Genauswahl besteht einerseits die Möglichkeit, positionelle Kandidatengene, d.h. Gene, die in einer Region mit einem signifikanten Kopplungsergebnis liegen, auf eine Assoziation mit der Erkrankung hin zu untersuchen. Alternativ dazu bieten sich Gene an, deren Funktion mit einer der bekannten Schizophreniehypothesen in Verbindung steht. Außerdem können die Wirkmechanismen der bekannten Neuroleptika Hinweise auf potentielle Kandidatengene geben.

2.6.8 Dopaminhypothese

Die biologische Forschung der Schizophrenie wurde über Jahrzehnte hinweg von der Dopamin-Hypothese geprägt, die eine Überaktivität dopaminerger Neurone postuliert (Carlsson 1967; Carlsson und Lindqvist 1963). Sie basiert auf den pharmakologischen Befunden, dass Neuroleptika Dopamin-D2-Rezeptoren blockieren und dass durch Dopaminagonisten wie Amphetaminen schizophrenieähnliche Psychosen ausgelöst werden können (Kapur et al. 1996; Snyder 1981). Diese Hypothese wird jedoch durch die Tatsache limitiert, dass die Medikation mit klassischen Neuroleptika zwar eine Besserung der Positivsymptomatik bewirkt, jedoch die negativen Symptome kaum beeinflusst (Metzler 1997). Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde eine revidierte Dopaminhypothese postuliert, die nicht mehr von einem generellen Überangebot an Dopamin ausging, sondern eine Imbalance zwischen kortikalen und subkortikalen Systemen postulierte. Durch eine Hyperaktivität des mesiolimbischen Dopaminsystems wird die Entstehung positiver Symptomatik erklärt, während die dopaminerge Hypoaktivität im frontalen Bereich mit schizophrener Negativsymptomatik in Zusammenhang gebracht wird (Davis et al. 1991).

Untersuchungen zur D2-Dopaminrezeptordichte und zu Konzentrationsveränderungen von Hauptmetaboliten des Dopamins im Liquor erbrachten widersprüchliche Resultate (Hietala et al. 1994; Martinot et al. 1990; Wong et al. 1990; Kornhuber und Weller 1994).

In molekulargenetischen Studien konnte eine Assoziation des COMT-Gens mit Schizophrenie gezeigt werden (Shifman et al. 2002; Li et al. 2000; Grossman et al. 1992). Dieses spielt eine bedeutende Rolle im Dopaminmetabolismus und liegt außerdem in einer Region auf Chromosom 22, für die von beiden Metaanalysen ein starkes Kopplungssignal vorliegt.

Da die Komplexität der schizophrenen Symptomatik durch eine alleinige Fehlfunktion des dopaminergen Systems nicht hervorgerufen werden konnte, setzte sich die Betrachtungsweise durch, dass auch andere in enger Beziehung zu diesem stehende Neurotransmittersysteme, wie das glutamaterge System, an der Genese der Schizophrenie beteiligt sein könnten.

2.6.9 Glutamathypothese

Die Glutamathypothese der schizophrenen Psychosen geht von einer Unterfunktion des glutamatergen Systems aus. Kim et al. konnten 1980 erstmals verminderte Glutamatspiegel bei Schizophreniepatienten nachweisen (Kim et al. 1980). Von zahlreichen weiteren Autoren konnte ein primär hypoaktives glutamaterges System bei Schizophrenie bestätigt werden (Goff und Coyle 2001; Meador-Woodruff und Healy 2000; Jentsch und Roth 1999; Olney und Faber 1995).

2.6.9.1 Gene des glutamatergen Systems

Ausgehend von der Glutamathypothese fokussierte sich in den letzten Jahren die Suche nach Kandidatengenen auf das Umfeld des glutamatergen Systems.

2.6.9.1.1 Neuregulin1

Eines der am häufigsten untersuchten Gene ist das Neuregulin1-Gen. Es liegt innerhalb der Region auf Chromosom 8, in der von beiden aktuellen Metaanalysen ein Kopplungssignal gefunden wurde. Eine Assoziation von Neuregulin 1 mit Schizophrenie konnte von zahlreichen Assoziationsstudien bestätigt werden (Stefansson et al. 2002; Stefansson et al. 2003; Williamset al. 2003; Yang et al. 2003; Tang et al. 2004; Corvin et al. 2004; Li et al. 2004), jedoch nicht von allen (Iwata et al. 2004).

Neuregulin spielt eine wichtige Rolle bei der Expression und Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Neuregulin-mutierte Mäuse weniger funktionelle NMDA-Rezeptoren exprimieren als Kontrolltiere. Außerdem zeigen diese Tiere Verhaltensauffälligkeiten, welche durch das atypische Antipsychotikum Clozapin teilweise wieder aufgehoben werden können (Stefansson et al. 2002).

2.6.9.1.2 DTNBP1 (Dysbindin)

Straub et al. untersuchten die Region 6p22, in der von Lewis ein signifikantes Kopplungsergebnis nachgewiesen wurde, und identifizierten innerhalb des Gens DTNBP1 (Dysbindin) mehrere mit Schizophrenie assoziierte SNPs (Straub et al. 2002). Die Region des Dysbindin-Gens wurde zuvor schon von zahlreichen anderen Autoren als Vulnerabilitäts-Region für Schizophrenie beschrieben (Maziade et al. 2001; Lindholm et al. 1999; Bailer et al. 2000; Hwu et al. 2000).

Dysbindin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, welches an den Dystrophin-Protein-Komplex bindet. Dieser ist als Bestandteil des Cytoskeletts an der Synapsenbildung und wahrscheinlich auch an der Signaltransduktion von NMDA- und GABA-Rezeptoren beteiligt (Benson et al. 2001). Die Assoziation von Schizophrenie mit dem Dysbindin-Gen wurde in weiteren Studien bestätigt (Tang et al. 2003; Schwab et al. 2003; Van Den Bogaert et al. 2003; Van Den Oord et al. 2003; Kirov et al. 2004; Williams et al. 2004), jedoch nicht von allen (Morris et al. 2003).

Es konnte jedoch bisher kein funktionell relevanter SNP identifiziert werden.

2.6.9.1.3 G72 und DAAO

Weitere Kandidatengene sind das DAAO-Gen und das Gen G72, welches von Chumakov et al. 2002 in einem 5-Mb großen Segment des Chromosoms 13q34 entdeckt wurde. In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie, die mit einer franko-canadischen und einer russischen Population durchgeführt wurde, konnte für mehrere SNPs und Haplotypen eine Assoziation mit Schizophrenie ermittelt werden (Chumakov et al. 2002).

Biochemische Untersuchungen lieferten den Nachweis, dass das Protein G72 das Enzym D-Aminosäure-Oxidase (DAAO) aktiviert, welches D-Serine, einen Agonisten der Glyzin-Seite des NMDAR oxidiert (Chumakov et al. 2002; Mothet et al. 2000).

Eine verminderte Konzentration an D-Serinen, wurde bereits bei schizophrenen Patienten gemessen (Hashimoto et al. 2003).

Die Erkenntnis, dass das Protein G72 und das Enzym DAAO via einer Reduktion von D-Serinen die Aktivität des NMDA-Rezeptors herabsetzen, machten sie zu interessanten Genen für weitere Untersuchungen. Das Gen G72 ist außerdem als positionelles Kandidatengen anzusehen. (s. Abb. 1)

Die Arbeitsgruppe um Schumacher konnte für beide Gene eine Assoziation mit Schizophrenie nachweisen (Schumacher et al. 2004). Ebenso konnte in einer chinesischen Studie eine Assoziation des Gens G72 gezeigt werden (Wang et al. 2004).

In einer US-amerikanischen Studie konnte jedoch nur eine grenzwertige Assoziation für einen SNP des G72 Gens nachgewiesen werden (Hall et al. 2004). Die Studie von Goldberg et al. lieferte negative Ergebnisse für beide Gene (Goldberg et al. 2004).

2.6.9.1.4 Gene des NMDA-Rezeptors (NMDAR)

Eine Assoziation eines Polymorphismus des NMDA-Rezeptors mit Schizophrenie konnte erstmals 2001 in einer japanischen Studie von Ohtsuki gezeigt werden, der zahlreiche SNPs des Grin2B-Gens untersuchte. Dieses Ergebnis konnte von einer nachfolgenden chinesischen Studie nicht repliziert werden. Allerdings konnte für einen Haplotyp eine Assoziation mit Schizophrenie nachgewiesen werden (Qin et al. 2005).

Auch eine Untersuchung an einem Patientenkollektiv kaukasischer Abstammung lieferte ein negatives Ergebnis (Williams et al. 2002).

Eine japanischen Studie, die das für die NR2-Untereinheit codierende Grin2A-Gen untersuchte, erbrachte eine schwache Assoziation eines Mikrosatelliten in der Promotorregion (Itokawa et al. 2003). Eine nachfolgende Studie mit größerer Patientenzahl konnte dieses Ergebnis jedoch nicht replizieren (Xinzhi et al. 2006).

Eine Assoziation mit Schizophrenie des Grin 1-Gens, das auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, konnte erstmals von der italienischen Forschergruppe um

Begni 2003 erbracht werden (Begni et al. 2003), nachdem vorhergehende Studien negative Ergebnisse ergeben hatten (Tani et al. 2002; Williams et al. 2002; Hung et al. 2002).

Trotz fehlender eindeutiger Assoziationsbefunde sind die Gene des NMDA-Rezeptors weiterhin potentielle Kandidatengene, da das auf einer NMDA-Rezeptor Hypofunktion basierende Psychosemodell derzeit zu den plausibelsten Schizophreniehypothesen zählt.

2.6.9.2 Pharmakologisch induzierte schizophrene Psychosen mittels NMDAR-Antagonisten

Die Hypothese, dass eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sein könnte, gründete sich auf der klinischen Beobachtung, dass nicht-kompetitive Antagonisten des NMDA-Rezeptors wie PCP, MK-801 oder Ketamin schizophrenieähnliche Psychosen verursachen können (Luby et al. 1959; Itil et al. 1967; Jentsch und Roth 1999; Javitt und Zukin 1991; Krystal et al. 1994; Abi-Saab et al. 1998).

Javitt und Zukin konnten 1991 zeigen, dass die Serumkonzentration von PCP, die Psychosen verursacht derjenigen entspricht, die NMDA-Rezeptoren blockiert (Javitt und Zukin 1991). Dieses pharmakologische Psychosemodell ist in der Lage, psychotische Symptome beim gesunden Probanden sowie eine Exacerbation beim Patienten zu induzieren (Javitt und Zukin 1991).

Im Vergleich zur Dopaminhypothese ahmen NMDA-Rezeptor Antagonisten Modelle der Schizophrenie sowohl das Spektrum der positiven Symptome als auch die Negativsymptomatik nach (Lathi et al. 1995; Malhotra et al. 1997; Malhotra et al. 1996; Lipska und Weinberger 2000; Gainetdinov et al. 2001).

Die durch subanästhetische Dosen von NMDA-Antagonisten verursachten Verhaltensweisen können durch antipsychotische Substanzen wieder aufgehoben werden (Kilts 2001). Andererseits hat sich die Steigerung der NMDA-Rezeptorfunktion mittels Agonisten der Glyzinseite des Rezeptors wie Glyzin, Serin oder D-Cycloserin (Henderson et al. 1990; Hood et al. 1989; Watson et al. 1990) in klinischen Studien als vielversprechende Komponente der Schizophrenietherapie erwiesen (Dall'Olio und Gandolfi 1993; Goff et al. 1995b und 1999b; Heresco-Levy et al. 1996a und 1999; Javitt et al. 1994; Tsai et al. 1998b).

2.6.9.3 Auswirkungen einer NMDA-Rezeptor Hypofunktion im Tierversuch

Weiterführende Studien mit Versuchstieren bestätigten und ergänzten das zuvor entwickelte, auf einer NMDA-Rezeptor Hypofunktion basierende, Psychosemodell.

Mohn et al. untersuchten die Auswirkungen einer reduzierten Expression der essentiellen NR1-Untereinheit des NMDAR auf das Verhalten von Mäusen. Versuchstiere, die nur 5% des normalen Levels der NR1-Untereinheit aufwiesen, waren zwar lebensfähig, zeigten aber Verhaltensauffälligkeiten wie sie beim pharmakologisch induzierten Tiermodell der Schizophrenie beobachtet werden (Mohn et al. 1999). Die Gabe von Haloperidol oder Clozapine bewirkte eine Besserung der Symptomatik.

Mäuse mit fehlender Epsilon 1 Untereinheit, dem äquivalent der humanen NR2A-Untereinheit, besaßen einen erhöhten Dopamin- und Serotoninmetabolismus und zeigten ebenso abnorme Verhaltensmuster (Miyamoto et al. 2001).

Rujescu et al. konnten bei Ratten, die unter der Medikation des selektiven nicht kompetitiven NMDA-Antagonisten MK-801 standen, Veränderungen auf molekularer, zellulärer und funktioneller Ebene sowie auf deren Verhalten zeigen, und somit die Theorie einer NMDA-Rezeptor Hypofunktion bei Schizophrenie bekräftigen (Rujescu et al. 2006). Im Hippocampus konnten sie im Einklang mit zuvor publizierten Ergebnissen bei Schizophreniepatienten (Gao et al. 2000) eine erhöhte Expression der NR2B-Untereinheit sowie der Exon 5 beinhaltenden Splice-Variante nachweisen. Übereinstimmend mit post-mortem Befunden bei Schizophrenen (Zhang und Reynolds 2002; Torrey et al. 2005), lag bei den untersuchten Ratten eine verminderte relative Anzahl an PV + Interneuronen vor. Außerdem zeigten die mit MK-801 behandelten Ratten kognitive Defizite sowie eine erhöhte elektrophysiologische Erregbarkeit der Pyramidenzellen, hervorgerufen durch eine Reduktion des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP).

2.7 Glutamat-Rezeptoren

Der am häufigsten vorkommende kortikale Neurotransmitter ist Glutamat (Mc Donald und Johnston 1990; Nakanishi 1992; Carlsson et al. 1997). Glutamat gilt außerdem als der am stärksten erregend wirkende Neurotransmitter (Cotman et al. 1987).

Im Gehirn existieren verschiedene Subtypen von Glutamatrezeptoren, die sich in ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterteilen lassen.

Die Gruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren besteht aus 3 Rezeptoren, die nach ihren spezifischen Bindungspartnern N-methyl-D-Aspartat (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propion Säure (AMPA) und Kainat bezeichnet werden (Hollmann und Heinemann 1994; Ozawa et al. 1998; Nakanishi et al. 1998; Kim et al. 1998).

Die metabotropen Glutamatrezeptoren bestehen jeweils aus 7 Transmembrandomänen und sind an ein G-Protein gekoppelt. Mittlerweile sind 8 Subtypen bekannt, die sich in 3 Gruppen einteilen lassen (De Blasi et al. 2001). Die zur Gruppe I gehörenden Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 stimulieren die Aktivität der Phospholipase C, die cAMP-Bildung und die Freisetzung von Arachidonsäure (Aramori und Nakanishi 1992). Die Rezeptoren der Gruppe II (mGluR2, mGluR3) und der Gruppe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) hemmen die Aktivität der Adenylat-Cyclase (Fagni et al. 2000; Pellicciari und Costantino 1999).

2.7.1 NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor ist einer von drei ionotropen Glutamat-Rezeptoren, an den NMDA, ein Analog zu Glutamat, bindet (Brewer und Cotman 1989).

Der NMDA-Rezeptor, ist wie alle ionotropen Glutamat-Rezeptoren, ein Heteromer, bestehend aus verschiedenen Untereinheiten, die zusammen einen funktionsfähigen Rezeptor bilden. Das Zentrum jedes Rezeptors enthält eine für Ionen durchlässige Pore. Dieser Ionenkanal ermöglicht den Aus- und Einstrom von Kationen und führt somit zu extra- und intrazellulären Reaktionen (Clements und Westbrook 1991; Rosenmund et al. 1998; Safferling et al. 2001). Charakteristisch für diesen Rezeptortyp ist eine spannungsabhängige Blockade durch Mg^{2+} -Ionen, eine hohe Ca^{2+} -Leitfähigkeit und eine ungewöhnlich lange Aktivierungs- und Deaktivierungsphase. Der NMDA-Rezeptor besitzt zahlreiche Bindungsstellen.

Einleitung

Neben den Bindungsstellen für Glutamat und Glyzin existiert eine Bindungsstelle für Kanalblocker wie PCP oder Mk-801, eine spannungsabhängige Mg^{2+} -Bindungsstelle, eine inhibitorische Bindungsstelle, an die Zn^{2+} bindet und eine Polyamin-Bindungsstelle (Abb. 2).

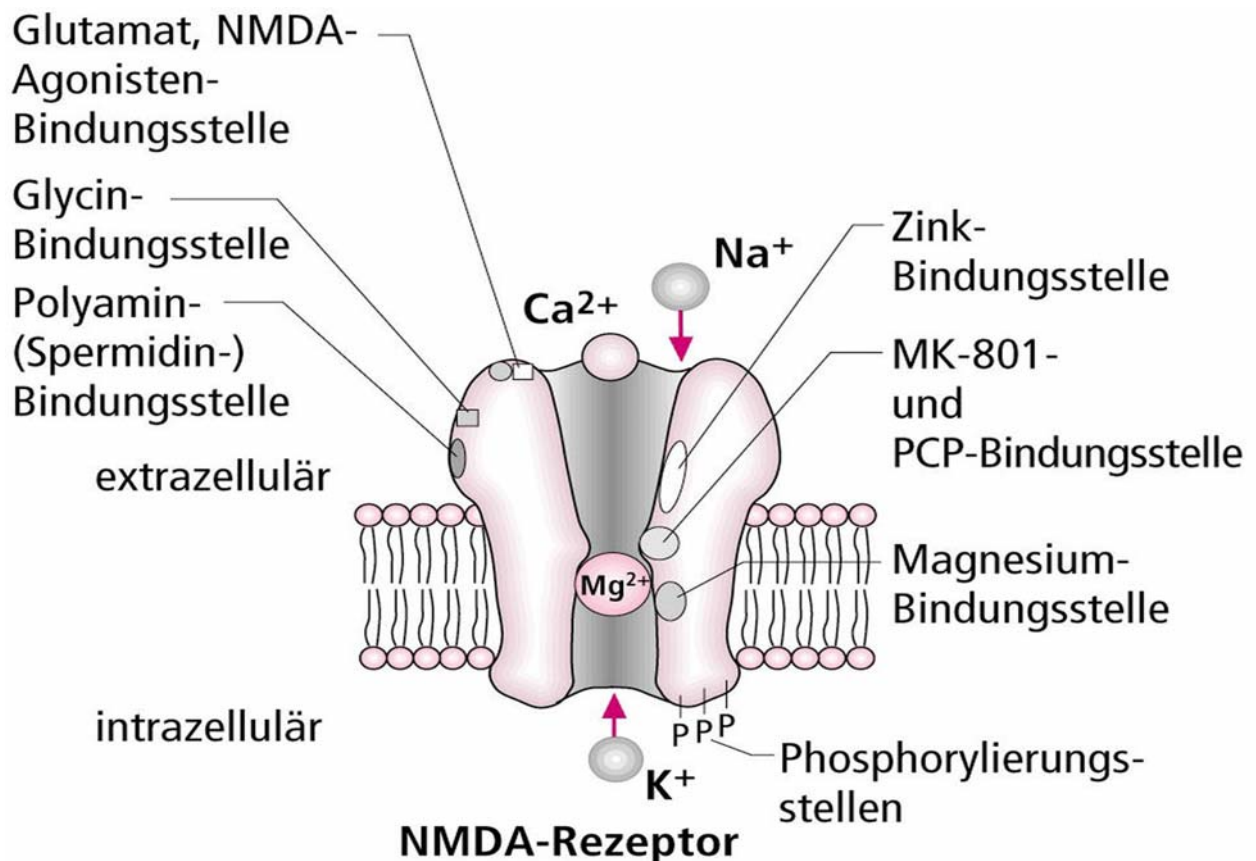


Abb. 2: Aufbau des NMDA-Rezeptors und Darstellung der Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten (aus Braus 2005)

2.7.1.1 Aufbau und Funktion

Der NMDA-Rezeptor setzt sich aus mehreren NR1 Untereinheiten und zwei oder drei NR2 Untereinheiten zusammen (Abb. 2) (Monyer et al. 1992; Hollmann und Heinemann 1994; Danysz und Parsons 1998; Dingledine et al. 1999; Yamakura und Shimoh 1999; Cull-Candy et al. 2001; Madden 2002; Millan 2002).

Von der NR1-Untereinheit existieren 8 Isoformen, resultierend durch das alternative Spleißen der Exons 5, 21 und 22. Unklar ist bisher, ob mehrere Isoformen innerhalb

Einleitung

eines Rezeptors vorkommen. Als Bestandteil des Ionenkanals ist die NR1-Untereinheit eine essentielle Komponente des Rezeptors. Außerdem befindet sich die Glyzin-Bindungsstelle an dieser Untereinheit (Kuryatov et al. 1994; Hirai et al. 1996; Kew et al. 2000).

Die Gruppe der NR2-Untereinheiten besteht aus den vier Subtypen NR2A, NR2B, NR2C und NR2D. Die NR2-Untereinheiten unterscheiden sich in 47-62% ihrer Aminosäuresequenz (Ikeda et al. 1992).

Innerhalb eines NMDA-Rezeptors können mehrere verschiedene NR2-Untereinheiten exprimiert werden. Auf der NR2-Untereinheit ist die Neurotransmitter-Bindungsregion mit Bindungsstellen für Agonisten wie Glutamat und kompetitive Antagonisten wie beispielsweise D-AP5 lokalisiert.

Der jeweilige NR2-Subtyp beeinflusst das Funktionsprofil und die Kinetik des Rezeptors sowie die Affinität und die Effizienz von Agonisten der Glycin-Bindungsstelle (Vicini et al. 1998; Cull-Candy et al. 2001; Sheinin et al. 2001; Madden 2002; Liu et al. 2004).

Eine neue Familie von NMDA-Rezeptor Untereinheiten, bestehend aus NR3A und NR3B, wurde kürzlich beschrieben (Sasaki et al. 2002; Nishi et al. 2001; Sucher et al. 1995). Die Aminosäuresequenz dieser beiden Subtypen ist zu etwa 50% homolog (Ciaberra et al. 1995). NR3A hat mindestens zwei Splice-Varianten (Sun et al. 1998). Die Integration der NR3 Untereinheit in den NMDA-Rezeptor via einer Komplexbildung mit der NR1 Untereinheit (Perez-Otano et al. 2001), führt zu einer Herabsetzung der Rezeptorfunktion. NR1/NR3 Untereinheiten bringen nur Glyzin-sensitive aber Glutamat-unempfindliche Rezeptoren mit geringer Ca^{2+} -Permeabilität hervor (Chatterton et al. 2002).

Obligat für die Aktivierung des Rezeptors sind zwei Co-Agonisten, die sich an die Glyzin- und die Glutamatbindungsstelle anlagern, die an der NR1-Untereinheit (Kuryatov et al. 1994; Hirai et al. 1996; Kew et al. 2000) und an der NR2-Untereinheit lokalisiert sind (Anson et al. 1998; Anson et al. 2000; Laube et al. 1998). Trotz der physischen Trennung dieser beiden Bindungsstellen beeinflussen sie sich gegenseitig (Danysz und Parsons 1998). Glyzin erhöht beispielsweise die Affinität und die Wirksamkeit von Glutamat durch seine Fähigkeit, die Desensibilisierungsphase zu verlängern und die Dauer und Frequenz der Kanalöffnung zu erhöhen (Dingledine et al. 1999).

Alle Typen von NMDA-Rezeptoren sind gekennzeichnet durch eine spannungsabhängige Blockade des Ionenkanals durch Mg^{2+} (Cull-Candy et al. 2001). Eine neuronale Depolarisation beseitigt die Mg^{2+} -Blockade und ermöglicht den Ioneneinstrom.

2.7.1.2 Expression der verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors

Die Ergebnisse zahlreicher, an Nagern - meist Ratten - durchgeführter *post-mortem* Studien liefern ein detailliertes Bild über die regionale Verteilung im ZNS der verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. Die NR1-Untereinheit ist in fast allen anderen Hirnregionen nachweisbar (Zukin et al. 1995). Die Isoformen der NR1-Untereinheit ohne das Exon 5 werden vorwiegend im Hippokampus, im Striatum und im Cerebellum exprimiert. Die Exon 5 beinhaltenden Isoformen sind hauptsächlich im Cerebellum lokalisiert (Laurie und Seeburg 1994).

Die Expression der NR2-Subtypen variiert stark je nach Hirnregion und Alter. Im Embryonalstadium ist die NR2B-Untereinheit in fast allen Hirnarealen nachweisbar. Die NR2D-Untereinheit ist zu diesem Zeitpunkt fast ausschließlich im Diencephalon und Hirnstamm exprimiert.

Bei 56 Tage alten Ratten ist die NR2A mRNA in fast allen Bereichen des Gehirns nachweisbar. Die NR2B mRNA ist zu diesem Zeitpunkt im cerebralen Cortex, im Hippokampus, im Striatum, im Thalamus und im olfaktorischen Bulbus zu finden. Die NR2C mRNA ist fast nur im Cerebellum messbar. Das Hauptvorkommen der NR2D mRNA liegt im Diencephalon, im Mittelhirn und im olfaktorischen Bulbus (Buller et al. 1994; Akazawa et al. 1994; Aamont et al. 1999; Wenzel et al. 1995; Dunah et al. 1993; Monyer et al. 1994).

Generell lässt sich sagen, dass im Laufe der Entwicklung ein Wechsel von NR2B beinhaltenden NMDA-Rezeptoren hin zu NR2A beinhaltenden Rezeptoren vollzogen wird. Die Expression der einzelnen Subtypen variiert jedoch stark je nach untersuchter Region, ja sogar an den verschiedenen Synapsen einer Zelle (Ito et al. 1997; Rumbaugh et al. 1999; Misra et al. 2000).

2.7.1.3 Einfluss der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten auf dessen Eigenschaften

Untersuchungen bezüglich der Affinität von Glyzin zur NR1 Untereinheit ergaben, dass diese vom Subtyp der NR2 Untereinheit abhängig ist (Priestley et al. 1995; Kew et al. 1998). Glyzin weist eine etwa 10-fach höhere Affinität zu NR2B-, NR2C oder NR2D enthaltenden im Vergleich zu NR2A enthaltenden NMDA-Rezeptoren auf (Buller et al. 1994; Laurie und Seeburg 1994; Priestley et al. 1995).

In *Xenopus* Oozyten konnte gezeigt werden, dass auch die Deaktivierungszeit des NMDA-Rezeptors von der vorliegenden NR1-Untereinheit beeinflusst wird. Diese schwankt um den Faktor 50 in der Reihenfolge NR2A < 2C=2C << 2D (Cull-Candy et al. 2001). Bei NR1/NR2A-Rezeptoren betrug die Deaktivierungszeit nach Glutamatapplikation nur wenige Millisekunden, wohingegen sich diese bei NR1/NR2D-Rezeptoren im Bereich von mehreren Sekunden bewegte (Monyer et al. 1994; Wyllie et al. 1998; Vicini et al. 1998).

Neben der Rezeptorkinetik wird auch die Ionenleitfähigkeit von der jeweiligen NR2-Untereinheit beeinflusst. NMDA-Rezeptoren, die NR2A oder NR2B-Untereinheiten enthalten, besitzen eine hohe Ionenleitfähigkeit, sind aber sensitiv gegenüber einer Mg^{2+} -Blockade. NR2C- oder NR2D-Untereinheiten beinhaltende Rezeptoren zeigen eine geringere Ionenleitfähigkeit, sind aber weniger sensitiv gegenüber extrazellulärem Mg^{2+} (Momiya et al. 1996). NR1/NR2A -Rezeptoren, die zusätzlich eine NR3-Untereinheit beinhalten, besitzen nur etwa 20% der Ca^{2+} -Leitfähigkeit im Vergleich zu NR1/NR2A-Rezeptoren (Das et al. 1998; Perez-Otano et al. 2001).

In mehreren Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur die NR2B-Untereinheiten, sondern auch die verschiedenen NR1-Isoformen die Rezeptoreigenschaften beeinflussen.

Die jeweils vorliegende Splice-Variante der NR1-Untereinheit beeinflusst die pH-Sensitivität des NMDA-Rezeptors. Splice-Varianten, die das Exon 5 beinhalten sind bei einem physiologischen pH-Wert vollständig aktiv, wohingegen diejenigen ohne Exon 5 teilweise blockiert sind (Traynelis et al. 1995). Es wird vermutet, dass die Exon 5 Kasette eine Oberflächenstruktur bildet, die Ähnlichkeiten zu Polyaminen aufweist, und als Abschirmung des Protonensensors der NR1-Untereinheit fungiert (Traynelis et al. 1995). Isoformen, die das Exon 5 beinhalten werden deshalb weder durch Polyamine stimuliert, noch durch Zn^{2+} inhibiert (Traynelis et al. 1998). Das

Exon 5 beeinflusst außerdem die Deaktivierungsgeschwindigkeit des Rezeptors. Bei Rezeptoren, die die NR1-1b-Untereinheit, die das Exon 5 beinhaltet, besitzen, ist diese 4 mal schneller, als bei Rezeptoren mit der NR1-1a-Untereinheit ohne das Exon 5 (Cull-Candy et al. 2001).

2.7.1.4 NR1-Untereinheit

Das humane Grin1-Gen, das für die NR1-Untereinheit codiert, befindet sich nahe des Telomers auf dem langen Arm des Chromosom 9 (9 q34.3) (Karp et al. 1993; Zimmer et al. 1995).

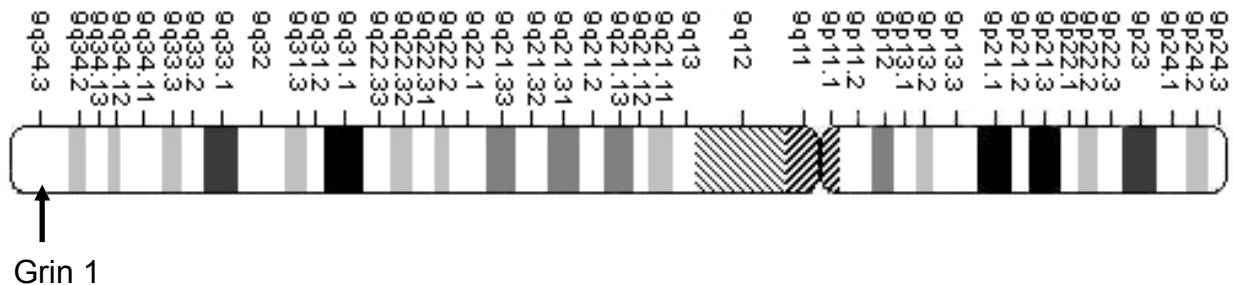


Abb.3: Chromosom 9

Schematische Darstellung des Chromosoms 9; die Position des Grin1-Gens ist mit einem Pfeil markiert

Für diesen Abschnitt des Chromosoms 9 konnte eine schwache Kopplung mit Schizophrenie von zwei Autoren nachgewiesen werden (Kaufmann et al. 1998; Riley et al. 1997). Von nachfolgenden Untersuchungen, bei denen das gesamte humane Genom untersucht wurde, konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Lewis et al. 2003; Badner et al. 2002), siehe dazu auch Abb.1.

Insgesamt besteht das NR1 Gen aus 22 Exons und 21 Introns (Dunah et al. 1999; Hollnann und Heinemann 1994).

2.7.1.4.1 Aufbau der NR1-Untereinheit

Die NR1-Untereinheit ist ein ca. 120 kDA großes Polypeptid (Kim et al. 1998), dass sich aus der Glyzinbindungsstelle, deren Lokalisation im Bereich der extrazellulären Segmente S1 oder S2 angenommen wird, drei Transmembrandomänen (TM1,TM3,TM4), einer extrazellulären N-terminalen Domäne und der intrazellulären

Einleitung

C-terminalen Region, die an mehreren Stellen von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden kann, zusammensetzt (Nakanishi 1992; Moriyoshi 1991). Weiterhin existiert ein viertes hydrophobes Element TM2, das in Form einer Haarnadelschleife den Ionenkanal bildet (Hollmann und Heinemann 1994).

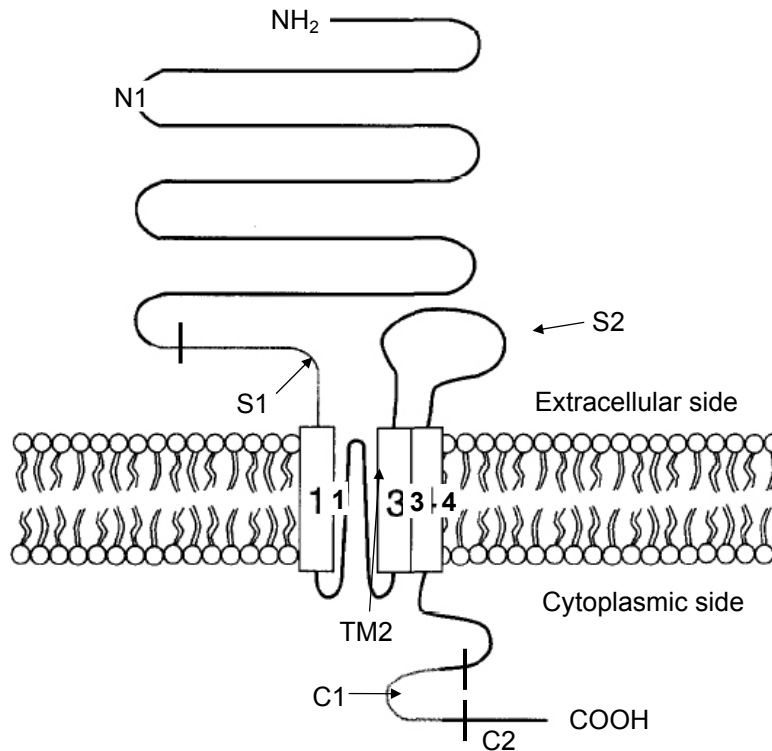


Abb.4: Schematische Darstellung der anzunehmenden Struktur der NR1 Untereinheit, welche die alternativen Spleißstellen für Exon 5 (N1), Exon 21 (C1) und Exon 22 (C2) enthält (nach Zukin et al. 1995).

Die Gruppe der NMDAR1-Untereinheiten besteht aus acht Isoformen (Durand et al. 1992; Sugihara et al. 1992), die durch das alternative Splicen der Exone 5, 21 und 22 entstehen (Hollmann und Heinemann, 1994). Das Exon 5 kodiert für eine aus 21 Aminosäuren bestehende N-terminale Kasette, welche die Rezeptordesensibilisierung und Sensibilität für Protonen, Zink-Ionen und Polyamine beeinflusst (Zukin und Bennett 1995). Die Exons 21 und 22 kodieren für die 37 bzw. 38 Aminosäuren langen C-terminalen Kassetten C1 und C2. Diese C-terminalen Kassetten wirken modulierend auf die NMDA-Rezeptorfunktion, indem sie das Zusammenspiel der verschiedenen Untereinheiten untereinander (Sheng et al. 1994) und mit anderen intrazellulären Molekülen, wie der Proteinkinase C (Tingley et al.

1993), Calmodulin (Ehlers et al. 1996) und mit Proteinen der postsynaptischen Dichte (Brenman et al. 1996; Lau et al. 1996) beeinflussen.

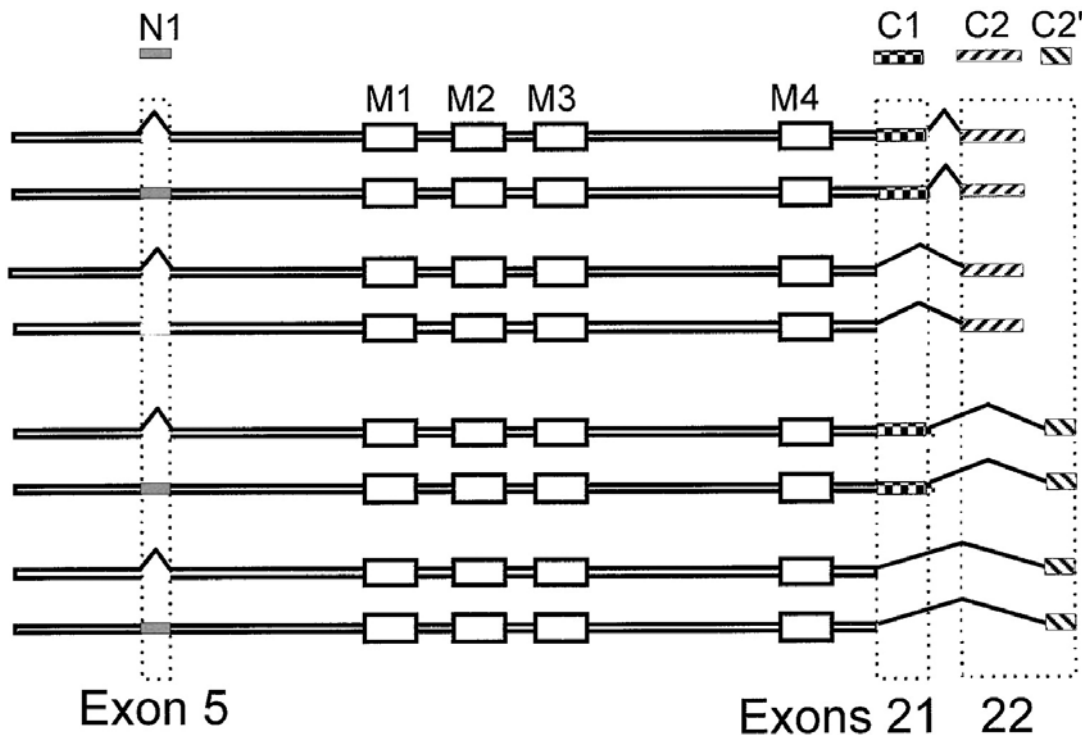


Abb. 5: Darstellung der 8 Isoformen der NR1-Untereinheit

Die weißen Boxen M1-M4 repräsentieren die vier transmembranen Domänen. N1 dient zur Bezeichnung von Exon 5, C1 von Exon 21 und C2 von Exon 22. Innerhalb der gestrichelten Gebiete findet alternatives Spleißen statt (aus Dingledine et al. 1999).

2.7.1.5 Intrazelluläre Vorgänge nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung

Sobald sich Glutamat anlagert, öffnet sich der NMDA Ionenkanal und ermöglicht den Durchtritt von Kalzium und Natrium, was wiederum zahlreiche intrazelluläre Vorgänge in Bewegung setzt. In den vergangenen Jahren wurde offensichtlich, dass der NMDAR mit mehreren intrazellulären Proteinen, die in der postsynaptischen Dichte (PSD) gelegen sind, interagiert.

In Abb.6 sollen diese Verbindungen veranschaulicht werden. PSD-95 Proteine steuern die NMDAR-Funktion, indem sie den Rezeptor in der PSD anhäufen und verankern, die NMDAR-Sensitivität für Glutamat modulieren und die NMDA vermittelten intrazellulären Prozesse koordinieren (Sheng und Pak 2000).

NF-L (Neurofilament Leichtkette) und Yotiao (Ehlers et al. 1998; Lin et al. 1998), wurden als Proteine identifiziert, die mit Exon 21-beihaltenden NR1-Isoformen interagieren.

Einleitung

NF-L gehört mit den beiden anderen neurofilamentären Untereinheiten NF-Schwer- und Mediumkette zu den häufigsten cytoskelettalen Elementen und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Struktur (Xu et al. 1994).

NF-L könnten auch daran beteiligt sein, die NMDAR an die PSD heranzuführen und/oder bei der Verbindung mit dem synaptischen Zytoskelett (Ehlers et al. 1998; Ehlers et al. 1995).

NF-L interagiert mit der Proteinphosphatase 1 (PP1), einer Protein/Serin/Threoninphosphatase, die an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt ist (Shenolikar 1994).

Obwohl die funktionelle Signifikanz dieser NF-L:PP1-Interaktion noch nicht vollständig geklärt ist, wird angenommen, dass NF-L PP1 bindet und es in Position bringt um andere PSD-Proteine wie NMDAR-Untereinheiten zu dephosphorylieren (Terry-Lorenzo et al. 2000).

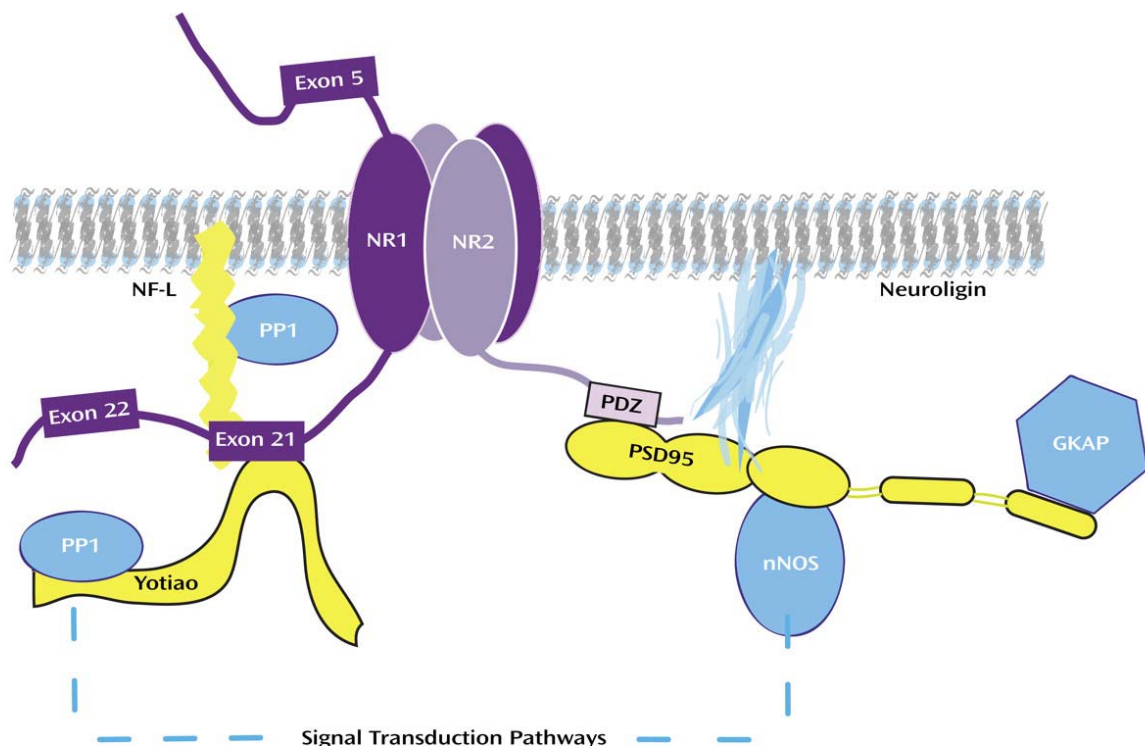


Abb. 6: NMDA-Rezeptor und assoziierte Proteine der postsynaptischen Dichte (PSD)

Dargestellt sind die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors und ihre Verbindungen zu Proteinen der postsynaptischen Dichte. Die PSD-Proteine NF-L und Yotiao interagieren mit Exon 21 enthaltenden NR1-Untereinheiten und verbinden diese mit dem Cytoskelett und der Proteinphosphatase 1 (PP1).

Die Proteine PSD95, SAP102 und PSD93 binden an den C-Terminus der NR2-Untereinheit und verbinden diesen mit intrazellulären Molekülen wie der neuronalen Stickoxid Synthase (nNOS) und dem Guanylatkinase assoziierten Protein (GKAP). Diese Proteine fungieren als Bindeglied zwischen dem NMDAR und nachgeschalteten Signalübertragungswegen (aus Clinton et al. 2003).

2.7.1.6 Einfluss des NMDAR auf die Hirnentwicklung

Die Synaptogenese lässt sich in die Phase des initialen Kontakts von Neuronen mittels Filopodien und der anschließenden Stabilisierungsphase unterteilen.

In der frühen neuronalen Entwicklung, strecken Neurone Filopodien aus, um die Umgebung nach präsynaptischen Partnern abzusuchen (Lee und Sheng 2000; Wong und Wong 2000). Nachdem ein Filopodium den Kontakt zu einem potentiellen Partner hergestellt hat, liefern zelluläre Adhäsionsmoleküle den initialen Stimulus zur Bildung einer Synapse (Doherty et al. 1995; Murase und Schuman 1999). Vorgefertigte Proteinpäckchen, die in der Lage sind, Neurotransmitter freizusetzen, folgen der Adhäsion der Membranen und werden in der präsynaptischen Seite eingeschlossen (Ahmari et al. 2000; Haas 2000).

Die Freisetzung von Glutamat stimuliert die postsynaptische Membran dazu, Ankerproteine zu rekrutieren, die alle notwendigen Elemente für eine funktionsfähige postsynaptische Seite befestigen (Friedman et al. 2000). Ist die initiale Synapse gebildet, müssen die Aktivitäten der prä- und postsynaptischen Membran synchronisiert werden. Die postsynaptische Membran muss z.B. auf eine präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung reagieren. Der Fehlschlag einer Synchronisation führt zu einer instabilen postsynaptischen Membran und der Elimination der Synapse (Frank 1997).

Dieses Zusammenspiel scheint sich anfangs nach dem Zufallsprinzip abzuspielen, obwohl es durch eine überschießende Depolarisation ausgereifter benachbarter Synapsen erleichtert werden könnte (Wu et al. 1996).

Die Depolarisation von NMDAR und die Aktivierung der Kalzium/kalmodulinabhängigen Proteinkinase II (CaM Kinase) führt zum Einbau von AMPAR in die Synapse im weiteren Verlauf der Entwicklung (Wu et al. 1996).

Befinden sich schließlich beide Rezeptortypen in der Membran, dann aktiviert die Freisetzung von Glutamat sowohl AMPA- als auch NMDAR. AMPAR bewirken eine kurze postsynaptische Depolarisation, wodurch die Magnesiumblockade beseitigt wird und der Ionenfluss durch den NMDA-Rezeptor ermöglicht wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Synchronisation zwischen präsynaptischer Glutamatfreisetzung und reaktiver postsynaptischer Depolarisation etabliert.

Synapsen, die nur NMDAR beinhalten und keine AMPA/KainatR werden als „stille Synapsen“ bezeichnet. Diese sind nicht in der Lage, eine elektrophysiologische

Einleitung

Antwort bei einem normalen Ruhepotential auf eine Glutamatfreisetzung zu geben (Gomperts et al. 1998; Isaac et al. 1995; Liao et al. 1995; Wu et al. 1996). Das anfängliche Schicksal einer Synapse wird also durch die präsynaptische Glutamatfreisetzung und durch den Einbau einer ausreichenden Anzahl an von postsynaptischen NMDA und AMPA/KainatR bestimmt.

Eine herabgesetzte Aktivität oder verminderte Anzahl der NMDAR oder ein zu niedriger Glutamatspiegel bewirken eine verminderte Anzahl an Synapsen. Da im infantilen Gehirn ein Überangebot an synaptischen Verbindungen herrscht, bewirkt dies im Kindesalter keine klinischen Symptome. Im Laufe der Kindheit und Jugend erfolgt eine synaptische Restrukturierung, auch „pruning“ genannt. Bei diesem Vorgang werden gezielt Neuronen entfernt und die Zahl der Synapsen verringert (Huttenlocher 1984).

Sobald der Verlust an Synapsen eine kritische Marke erreicht hat, was zumeist in der späten Jugend oder im frühen Erwachsenenalter der Fall ist, treten die ersten Symptome einer schizophrenen Psychose auf.

In post mortem Untersuchungen erwachsener schizophrener Patienten konnte eine reduzierte Anzahl an Dendriten der Pyramidenzellen des Kortex (Garey et al. 1998; Glantz und Lewis 2000) und eine Verminderung des Neuropil nachgewiesen werden (Selemon und Goldman-Rakic 1999).

Eine NMDAR-Hypofunktion steht somit im Einklang mit der These, dass Schizophrenie auf einer neuronalen Entwicklungsstörung mit fehlerhaften neuronalen Verbindungen und einer herabgesetzten Synapsendichte beruht (Lewis & Libermann, 2000).

2.7.1.7 Einfluss des NMDAR auf die Neuroplastizität

Beim ZNS handelt es sich nicht um ein System, dessen Organisation sich in vorbestimmten Abläufen entwickelt, sondern permanenten Veränderungsprozessen unterworfen ist

Die Fähigkeit von Neuronen, sich an Umweltveränderungen anzupassen, ist entscheidend für das Überleben und ein wichtiger Aspekt der Gehirnfunktion. Diese Adaptionfähigkeit wird als Neuroplastizität bezeichnet.

Die Aktivierung des NMDAR als Folge einer Membrandepolarisation ermöglicht einen Kalziumeinstrom durch den Ionenkanal (Mac Dermott et al. 1986), der eine LTP, also eine zeitlich überdauernde Erregbarkeitssteigerung und Genexpressionen induziert (Malenka und Nicoll 1999).

Das freie intrazelluläre Kalzium aktiviert kalziumabhängige Enzyme wie CaM Kinasen und die Phosphatase Calcineurin (Thompson 2000). Diese Enzyme wirken mittels eines Rückkopplungsmechanismus modulierend auf die Rezeptorfunktion und sie aktivieren Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung von NMDAR durch CaM Kinasen erhöht den Glutamateinstrom durch deren Ionenkanäle (Omkumar et al. 1996; Swope et al. 1999; Wang und Salter 1994).

Des Weiteren beeinflusst die Phosphorylierung den Transport und Einbau von NMDAR in die postsynaptische Membran (Nicoll und Malenka 1999; Rongo und Kaplan 1999).

Die Phosphatase Kalzineurin verkürzt die Öffnungszeit des NMDAR-Ionenkanals (Shi et al. 2000, Tong et al. 1995, Lieberman und Mody 1994).

Der NMDAR ist somit in der Lage, die eigene Rezeptoraktivität und die Affinität gegenüber Glutamat zu steuern.

Diese kalziumabhängigen Kinasen gelangen außerdem in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren wie CREB phosphorylieren und somit aktivieren (Rajadhyaksha et al. 1999; Schulman 1995).

Einleitung

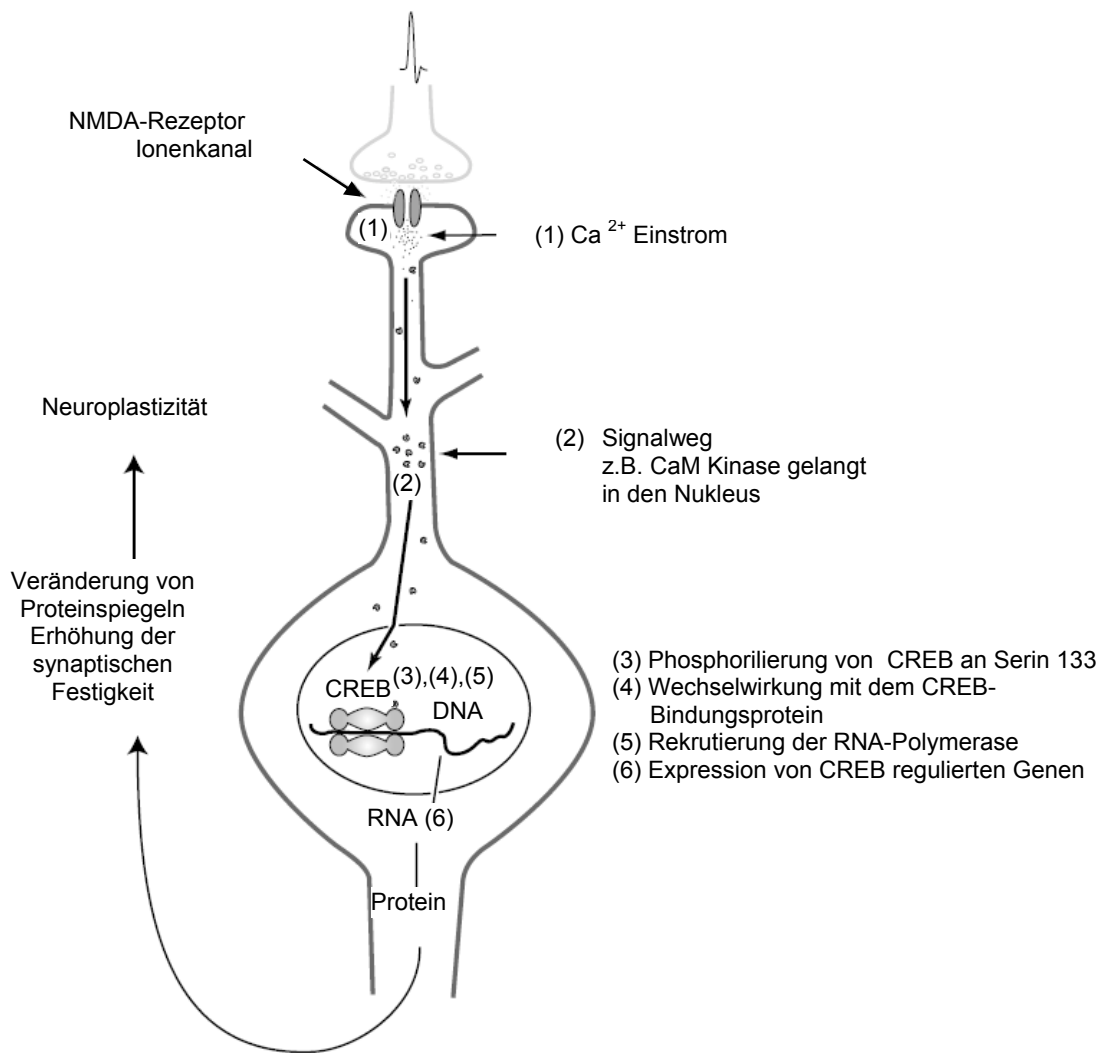


Abb. 7: Vorgänge nach Aktivierung von CREB

Der NMDA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Einstrom aktiviert CaM-Kinasen, die wiederum Transkriptionsfaktoren, wie CREB aktivieren. CREB stimuliert die Synthese verschiedener mRNAs und beeinflusst dadurch die Expression von Proteinen und die synaptische Festigkeit (nach Konradi und Heckers 2003).

2.7.1.8 NMDAR-Hypofunktion und Neurotoxizität

Der NMDAR ist auf GABAergen inhibitorischen Neuronen lokalisiert, die glutamaterge Pyramidenzellen hemmen. Liegt nun eine NMDAR-Hypofunktion vor, verursacht beispielsweise durch eine verminderte Synthese der NR1-Untereinheit, ist die Aktivität der GABAergen Neurone vermindert (Olney et al. 1991). Dieser verminderte inhibitorische Tonus bewirkt primär eine neuronenschädigende exzessive Glutamatfreisetzung. Olney und Faber konnten die neuronenschädigende

Einleitung

Wirkung übermäßiger glutamaterger Aktivität im Tierversuch nachweisen (Olney und Faber 1995).

Von dieser zytotoxischen Zerstörung sind auch die GABA-Interneurone betroffen. In Post-mortem-Studien zeigte sich hiermit konsistent eine Abnahme GABAerger Interneurone im Gyrus cinguli und präfrontalen Kortex sowie eine sekundär erhöhte Anzahl an GABA-Rezeptoren (Benes et al. 1992).

Die glutamatergen Pyramidenzellen, bei denen nun die GABAerge Hemmung fehlt, werden durch den Einfluss anderer glutamaterger, dopaminerger und cholinergischer Rezeptoren geschädigt und können degenerieren. Ein Indiz für diese These ist ein postmortal gemessenes vermindertes Pyramidenzellvolumen (Rajkowska et al. 1998). Sekundär entsteht durch die Schädigung der Pyramidenzellen eine glutamaterge Unterfunktion in den langen Projektionsbahnen, welche im Einklang mit der Glutathypothese der Schizophrenie steht, die von zahlreichen Autoren vertreten wird (Kim et al. 1980; Olney und Faber 1995; Goff und Coyle 2001).

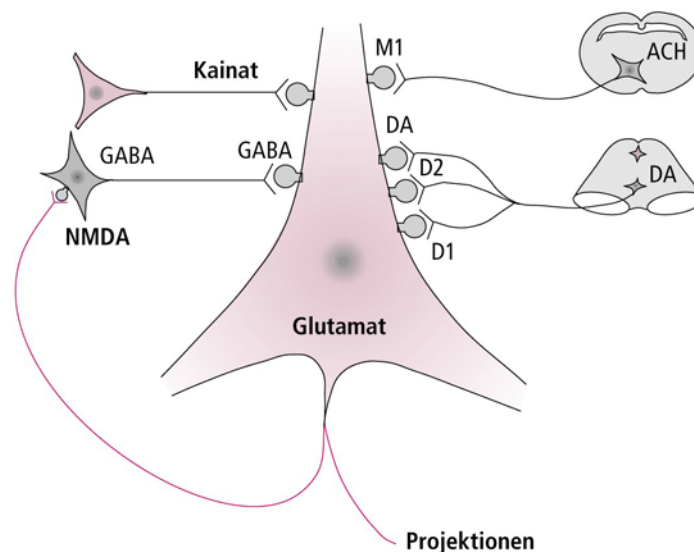


Abb. 8: Darstellung der Folgen einer NMDAR-Hypofunktion

Der NMDA-Rezeptor sitzt auf GABAergen inhibitorischen Neuronen, die wiederum glutamaterge Pyramidenzellen hemmen. Bei einer NMDA-Rezeptor Unterfunktion ist die GABAerge Hemmung vermindert und die Pyramidenzelle wird durch andere exzitatorische Einflüsse geschädigt. Es resultiert eine glutamaterge Minderfunktion in den Projektionen (aus Braus 2005)

2.7.1.9 Veränderungen des NMDAR bei Schizophrenie

Zahlreiche neurochemische Studien wurden durchgeführt, um die Hypothese einer gestörten NMDAR-Funktion bei Schizophrenie zu untermauern.

Die meisten Ergebnisse liegen für den Thalamus, einer bei Schizophrenie fehlgesteuerten Struktur vor (Clinton und Meador-Woodruff 2004a,b).

Es konnte ein deutlicher Abfall der für die NR1-Untereinheit codierenden mRNA gezeigt werden (Ibrahim et al. 2000; Meador-Woodruff et al. 2003). Von einer weiteren Studie konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden (Popken und Leggio 2002).

Ibrahim et al. konnten mittels des GlyzinB Radioliganden [³H]MDL105,519 eine verminderte Anzahl an NR1-Untereinheiten nachweisen (Ibrahim et al. 2000).

Von besonderer Bedeutung wäre hierbei eine verminderte Expression der NR1-Isoform, die das Exon 22 beinhaltet, da dieses Exon mit der „*postsynaptic density*“ interagiert. Damit im Einklang stehen zahlreiche Studien, die eine veränderte Expression von Genen die für mehrere dieser „*postsynaptic density*“ Proteine codieren, nachweisen konnten (Clinton et al. 2003; Meadoe-Woodruff et al. 2003; Clinton und Meador-Woodruff 2004a,b).

Untersuchungen bezüglich der mRNA Konzentrationen der NR2 Untereinheit ergaben verminderte Werte für die NR2B und NR2C Isoformen (Ibrahim et al. 2000; Popken et al. 2002).

Im Umfeld des NMDAR konnte eine vermehrte Expression der Glutamattransporter EAAT1 und 2 nachgewiesen werden, was auf einen erhöhten Glutamatabbau schließen lässt (Smith und Haroutunian 2001; Ibrahim et al. 2000).

Komplettiert wird die Palette der Veränderungen der glutamatergen Funktion durch eine erhöhte Expression des vesikulären Glutamattransporters vGluT2 und des Enzyms Glutaminase (Smith und Haroutunian 2001a,b; Meador-Woodruff et al. 2003).

All diese Veränderungen deuten auf eine erhöhte Glutamatverfügbarkeit hin.

Der Thalamus liefert wichtige afferente Bahnen zum Kortex. Dieser Informationszufluss scheint bei Schizophrenie aufgrund einer unzureichenden Filtertätigkeit des Thalamus erhöht zu sein (Carlsson et al. 2001; Clinton und Meador-Woodruff 2004a,b).

Die Ergebnisse für den Kortex variieren erheblich je nach untersuchter Region.

Einleitung

Eine verringerte Konzentration der NR1-Untereinheit konnte im entorhinalen und temporalen Kortex gezeigt werden. Die Bandbreite der Ergebnisse für den frontalen Kortex erstreckt sich jedoch von einer verminderten Anzahl bis zu einem Anstieg der NR1-Untereinheit (Meador-Woodruff und Healy 2000; Millan 2002; Van Berckel 2003).

Mittels Bestimmung von quantitativer mRNA Expression konnte ein relativer Anstieg der NR2A-Untereinheit im frontalen und occipitalen Kortex und der NR2D-Untereinheit im präfrontalen Kortex gezeigt werden. Eine erhöhte Anzahl an NR2B-Untereinheiten im temporalen Kortex konnte via Radioligandenbindung gezeigt werden (Akbarian et al. 1996; Grimwood et al. 1999; Drachewa et al. 2001; Woo et al. 2004).

Gründe für diese divergierenden Ergebnisse könnten der Einfluss der Behandlung mit Antipsychotika, der Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Messung, das Patientenalter und Unterschiede zwischen den verschiedenen cerebralen Strukturen sein.

Eine verminderte NMDAR Dichte könnte eine verminderte Rezeptorfunktion widerspiegeln. Andererseits wurde eine erhöhte Rezeptorendichte als Kompensation für eine verminderte Stimulation durch endogene Liganden ausgelegt.

2.8 Genetische Variationen des Grin 1 Gens

Rice et al. führten als erste Forschergruppe eine groß angelegte Studie mit Probanden verschiedener ethnischer Abstammung durch, mit dem Ziel das gesamte Grin1-Gen auf Basenaustauschpolymorphismen hin zu untersuchen. Sie konnten 28 Mutationen, die über das gesamte Gen verteilt lagen, identifizieren (Rice et al. 2001). Die Anzahl polymorpher Stellen im Grin1-Gen hat sich bis zum jetzigen Zeitpunkt auf ca. 93 erhöht.

2.8.1 Auswahl der SNPs

In der 5'UTR des NMDAR1-Gens wurde in der vorliegenden Arbeit ein Basenaustauschpolymorphismus von Guanin nach Cytosin an der Stelle -855 untersucht. Für diesen SNP wurde bereits eine Assoziation mit Schizophrenie nachgewiesen (Begni et al. 2003; Zhao et al. 2006). Das Allel mit der häufigeren Frequenz in der Bevölkerung ist das G-Allel. Dies trifft für unterschiedliche ethnische Gruppen zu (Hung et al. 2002; Martucci et al. 2003). In einer kaukasischen Stichprobe (Begni et al. 2003) von 145 Probanden wurde es mit 91% benannt, das C-Allel mit 9%.

Dieser Basenaustauschpolymorphismus befindet sich in der Promotorregion (Rice et al. 2001). Promotoren sind in der Lage, die Genexpression zu steuern, indem sie die Transkription, die Stabilität der mRNA und die Translationsleistung beeinflussen. Sie beinhalten zahlreiche funktionelle Elemente wie Haarnadelstrukturen, Bindungsstellen für eisenregulierende Proteine, interne Ribosomeintrittsstellen, AUG-Codons und offene Leseraster (Meijer und Thomas 2002; Wilkie et al. 2003). Begni et al. konnten zeigen, dass der Basenaustausch von Guanin nach Cytosin das erste Nukleotid der GGGG Consensussequenz für die p50 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-kappaB verändert und somit dessen Aktivität beeinflusst (Begni et al. 2003).

Der zweite untersuchte Basenaustauschpolymorphismus ist in Exon 7 des NMDAR1-Gens lokalisiert. Dieser führt zu einem Austausch von Guanin (G) nach Adenin an der Position 17438 (Rice et al. 2001). Das in der allgemeinen Bevölkerung häufigere Allel ist das A-Allel (Paus et al. 2004). Dies trifft auch für andere ethnische Gruppen zu (Rice et al. 2001). Obwohl für diesen SNP bisher keine funktionelle Relevanz

Einleitung

nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass dieser im Kopplungsungleichgewicht mit einem kausalen Schizophrenielokus steht.

Folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die vorliegenden Assoziationsstudien zu Einzel Nukleotid Polymorphismen des Grin1-Gens.

Tab. 1: Übersicht der Assoziationsstudien zum Grin1-Gen

Autor	Jahr der Publikation	Population	Signifikanz
Sakurai	2000	Japan	keine
Hung	2002	Taiwan	keine
Williams	2002	Großbritannien	keine
Tani	2002	Japan	keine
Begni	2003	Italien	rs11146020
Martucci	2003	Kanada	keine
Paus	2004	Deutschland	keine
Qin	2005	China	keine
Zhao	2006	China	rs11146020, rs2301363, hCV1840191, rs11146026

3 Fragestellung

Es gilt heute als gesichert, dass eine starke genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie vorliegt. Die genaue Ätiologie schizophrener Erkrankungen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind eine empfindliche Methode, um auf molekulargenetischer Ebene nach Suszeptibilitätsgenen mit kleinen Effekten bei komplexen Krankheiten wie Schizophrenie zu suchen.

Zahlreiche Untersuchungen schizophrener Patienten deuten auf Veränderungen im glutamatergen System hin. Eine Schlüsselrolle scheint hierbei der NMDA-Rezeptor zu spielen. Eine verminderte NMDAR1 Expression führte im Tierversuch zu Verhaltensauffälligkeiten, die dem pharmakologischen Psychosemodell in Realität entsprechen. Beim Menschen konnte das klinische Erscheinungsbild der Schizophrenie durch die Gabe von Antagonisten des NMDAR wie beispielsweise PCP hervorgerufen werden. Des weiteren deuten die Ergebnisse neurochemischer Studien auf eine veränderte Expression von NMDAR-Untereinheiten bei Schizophrenie hin.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen Polymorphismen des NMDAR1-Gens, welches an der Hirnentwicklung, der Neuroplastizität und an neurotoxischen Vorgängen beteiligt ist, mit der Schizophrenie zu untersuchen.

Dazu wurden Allel- und Genotypfrequenzen bei 229 schizophrenen Patienten im Vergleich zu einer Kontrollpopulation, bestehend aus 389 Probanden, bestimmt und auf Assoziation überprüft.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tab. 2: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waagen	Explorer	Ohaus Corporation, USA
	PRECISA 1620 C	PRECISA Instruments AG, Dietikon
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen steril	Greiner Labortechnik
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
	Mastercycler	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Tiefkühlschrank	Economic (– 20 °C)	Bosch, München
Ultra-Tiefkühlschrank	U725	New Brunswick Scientific
Pipetten		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Gelkammer	Wide Mini Sub Cell GT, Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Spannungsquelle	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eagle Eye	Eagle Eye II Photosystem	Stratagene, La Jolla, USA
Photometer	Genequant	Pharmacia Biotech
Wasserbad	WB 14	Memmert GmbH u. CoKG, Schwabhausen
Mikrowelle	Privileg 9024 E	Privileg
Vortexer	Reax	Heidolph

4.1.2 Software

Tab. 3: Software

Anwendung	Software	Hersteller/ Internetadresse
Statistische Auswertung	SPSS 12.01	Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA
SNP Suche	SNPper	http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter
Primer Spezifität	Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Primerdesign	Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

4.1.3 Chemikalien

Tab. 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Streptokinase	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
dNTP 10 mM	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Primer	Fa. Life Technologies, Karlsruhe
BseRI-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (5' UTR)	New England Biolabs, Frankfurt
Btg I-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (Exon 7)	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase (rekombinant) 1 U /µl	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
10 x NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalzdihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid Solution 10 mg /ml	Bio Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Ladder 100 bp, 0,5 mg DNA /ml	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
30% Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

4.1.4 Oligonukleotide

Tab. 5: Oligonukleotide

Name	Orientierung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
nmutr1	forward	ggg taa ggc tct gga aaa gg	rs11146020
nmutr2	reverse	ctc ccc aca agg ttc aga aa	rs11146020
nm1ex7f4	forward	gtg gga gtg ctg gag tcc t	rs1126442
nm1ex7r4	reverse	ggt cgg tga tgt tct cct tc	rs1126442

4.1.5 Polymorphismen

Tab. 6: Polymorphismen

Gen	Accession Nr.	SNP	Position	Allel	Funktion
Grin 1	Z32772	rs11146020	-855	C/G	5'UTR
Grin 1	Z32744	rs1126442	17438	A/G	Exon 7

4.2 Methoden

4.2.1 Studienteilnehmer

4.2.1.1 Kontrollgruppe

Die Gruppe der Studienteilnehmer umfasste 389 nicht verwandte Freiwillige aus der allgemeinen Bevölkerung des Einzugsbereichs von München. Ihr Alter lag zwischen 19 und 69 Jahren bei einem Mittelwert von 47 Jahren. 47.3% der Teilnehmer waren männlichen und 52.7% weiblichen Geschlechts.

Das Rekrutierungsverfahren gliederte sich in mehrere Phasen. Die potentiellen Studienteilnehmer wurden zunächst per Post angeschrieben. Bei Interesse erfolgte ein detailliertes Telefonscreening. In diesem wurde versucht, eventuelle psychiatrische oder hirngorganische Erkrankungen bei den potentiellen Probanden und bei Verwandten ersten Grades zu eruieren. Lagen keine Hinweise auf eine Erkrankung vor, folgte eine ausführliche schriftlich somatische und psychiatrische Anamnese der Studienteilnehmer und ihrer Verwandten ersten Grades, mit dem Ziel etwaige Vorerkrankungen zu erfassen. Von Interesse waren hierbei depressive, schizophrene oder manische Phasen, Essstörungen, Alkohol- oder Drogenabusus, Angstzustände, Suizidversuche sowie weitere psychiatrische Erkrankungen. Außerdem wurde überprüft, ob die Teilnehmer deutschen Ursprungs waren. Die Studienteilnehmer, die dieses Prozedere durchlaufen hatten, wurden zu einem strukturierten klinischen Interview eingeladen.

Die Diagnostik eventuell vorhandener psychiatrischer Erkrankungen erfolgte nach den Kriterien des von der American Psychiatric Association herausgegebenen DSM IV. Das SKID I wurde zur Diagnosefindung von Achse I-Störungen herangezogen. Das SKID II diente zur Erfassung von Persönlichkeitsstörungen auf der Achse II (First et al. 1997; Wittchen et al. 1997). Für die psychiatrische Familienanamnese kam das Family History Assessment Modul zur Anwendung (Rice et al. 1995)

Lagen relevante somatische Krankheiten oder Achse I/II-Störungen oder eine positive psychiatrische Familienanamnese vor, erfolgte der Studienausschluß.

4.2.1.2 Schizophrene Patienten

Für die Studie wurden 229 schizophrene Patienten untersucht. Deren Alter lag zwischen 18 und 65 Jahren, bei einem Mittelwert von 38 Jahren. Die Patientengruppe bestand zu 59.8% aus Männern und zu 40.2% aus Frauen.

Im ersten Schritt wurde eine standardisierte Anamnese erhoben. In dieser wurde u.a. die Lebensgeschichte, der Krankheitsverlauf, die Medikation, stationäre Aufenthalte in psychiatrischen Kliniken, der schulischen und beruflichen Werdegang, die familiäre Situation und die ethnische Abstammung abgefragt. Patienten mit organischen oder substanzinduzierten Störungen, die psychotische Symptome verursachen können, wie zum Beispiel der Missbrauch von Alkohol, Drogen oder Medikamenten sowie das Vorliegen einer Demenz, einer Epilepsie, eines Morbus Parkinson oder ähnlichen relevanten Störungen wurden von der Studie ausgeschlossen.

Die Erfassung der klinischen Störung erfolgte durch das Strukturierte Klinische Interview I (SKID I). Differentialdiagnostisch war hier das Vorliegen einer schizoaffektiven Störung oder schizotypischen Persönlichkeitsstörung auszuschließen.

Mit dem SKID II wurden Störungen der Persönlichkeit erfasst.

Mit der PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia) (Kay et al. 1987) wurden die Positiv- und Negativsymptome sowie allgemeine psychopathologische Symptome in 7 Graduierungen bewertet.

Nur Patienten mit der Diagnose einer Schizophrenie vom paranoiden-, desorganisierten-, katatonen-, undifferenzierten- oder residualen Typus gemäß den Kriterien des DSM IV wurden in die Studie aufgenommen.

4.2.1.3 DNA-Extraktion

Das bei -80°C gelagerte Blut der Probanden wurde für die DNA-Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Gewinnung der genomischen DNA aus dem mit EDTA versetzten Blut der Probanden erfolgte mittels eines Kits der Firma Qiagen gemäß des Handbuchs (Qiagen 2001).

Die Lyse der Leukozyten und Freisetzung der Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 500 µl Proteinkinase K je 5 bis 10 ml Vollblut herbeigeführt. Die Beimengung von

12 ml AL-Puffer (Guanidin-HCL) sorgte für ideale Reaktionsbedingungen für die Proteinkinase K und entzog der DNA außerdem die Hydrathülle, welche eine Bindung der DNA an die Silikagel-Membran behindert. Anschließend wurde die Lösung 2 Minuten gevortext, um eine vollständige Zellyse zu erhalten. Eine 30 minütige Inkubation der Lösung im Wasserbad bei 70°C gewährleistete einen maximalen DNA-Ertrag.

Die Extraktion der gewünschten Nukleinsäuren aus der Lösung erfolgte durch Bindung an eine Silikamembran. Der Probe wurde 10 ml Ethanol (96-100%) zugegeben, um das Gemisch auf das Säulenmaterial zu fällen. Es folgte eine 2-minütige Vermischung mit dem Vortexer. Anschließend wurde die DNA-Lösung sukzessive auf die Silikagel-Säule überführt und jeweils für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung von RNA und Proteinverunreinigungen wurden 5 ml eines Guanidin-HCL haltigen Waschpuffers zugegeben und für eine Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte die Zugabe von 5 ml ethanolhaltigem Waschpuffer und eine 15 Minuten lange Zentrifugation bei 5000 rpm, um die Guanidiniumsalze zu entfernen.

Die Elution der DNA von der Silikamembran geschah durch Zugabe von 1 ml des basischen AE-Puffer (Tris-Puffer, pH>9.0). Im letzten Arbeitsschritt wurde die DNA für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit dem AE-Puffer inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die im AE-Puffer enthaltene DNA konnte nun für die PCR verwendet werden.

4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie ermittelt. Bei dieser Methode macht man sich die Erkenntnis zu nutze, dass die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ihrem DNA-Gehalt direkt proportional ist. Eine DNA-Lösung von 50 µg/ml ergibt bei einer Wellenlänge von 260 nm= $\lambda_{1,1}$, welche dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren entspricht, eine Absorption von 1,0 (Sambook 1989).

Vor der Messung wurde das Photometer mit einer Lösung aus 95 µl Aqua bidest. und 5 µl AE-Puffer geeicht. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 5 µl der DNA-Lösung mit 95 µl Aqua bidest. verdünnt und in eine Quarzglasküvette gegeben.

Die DNA-Konzentration lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$\lambda \cdot 1 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Abschließend wurden die DNA-Lösungen auf eine Konzentration von 25 ng/μl standardisiert.

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA, die 1983 von Kary Mullis und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde (Mullis 1990; Saiki et al. 1985).

Mittels einer speziellen DNA Polymerase kann ein DNA-Segment amplifiziert werden, das zwischen zwei Regionen bekannter Basensequenzen liegt. Gegen diese beiden Regionen werden komplementäre Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die nach ihrer Bindung an die vorher aufgetrennten DNA Einzelstränge als Starterkennung für die Polymerase dienen. Die Sequenzen der Primer werden so gewählt, dass sie an der einen Seite an den sense-Strang und an der anderen Seite an den komplementären Strang hybridisieren. Stehen ausreichend Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zu Verfügung und liegt ein geeignetes Puffersystem vor, ist es nun möglich, exakte Kopien der vorhandenen DNA-Fragmente zu synthetisieren.

Die PCR besteht aus drei Reaktionsschritten

Denaturierung

Im ersten Schritt werden die Doppelstränge der DNA, die das zu amplifizierende Fragment enthält, getrennt. Die Denaturierung erfolgt bei einer Temperatur von ca. 94°C.

Annealing

Nach dem Abkühlen auf etwa 50-70°C kann sich während der sogenannten Annealingphase jeweils ein Primer an einen DNA- Einzelstrang anlagern.

Elongation

Die so entstandenen kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmente dienen der Polymerase im dritten Schritt, der sogenannten Elongationsphase, als Startpunkte, von denen ausgehend sie in 5'-3'-Richtung komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Bei einer Temperatur von 72 °C entfaltet die Polymerase ihre maximale Aktivität.

Diese drei Reaktionsschritte, Denaturierung, Annealing und Elongation, werden in der PCR zyklisch wiederholt.

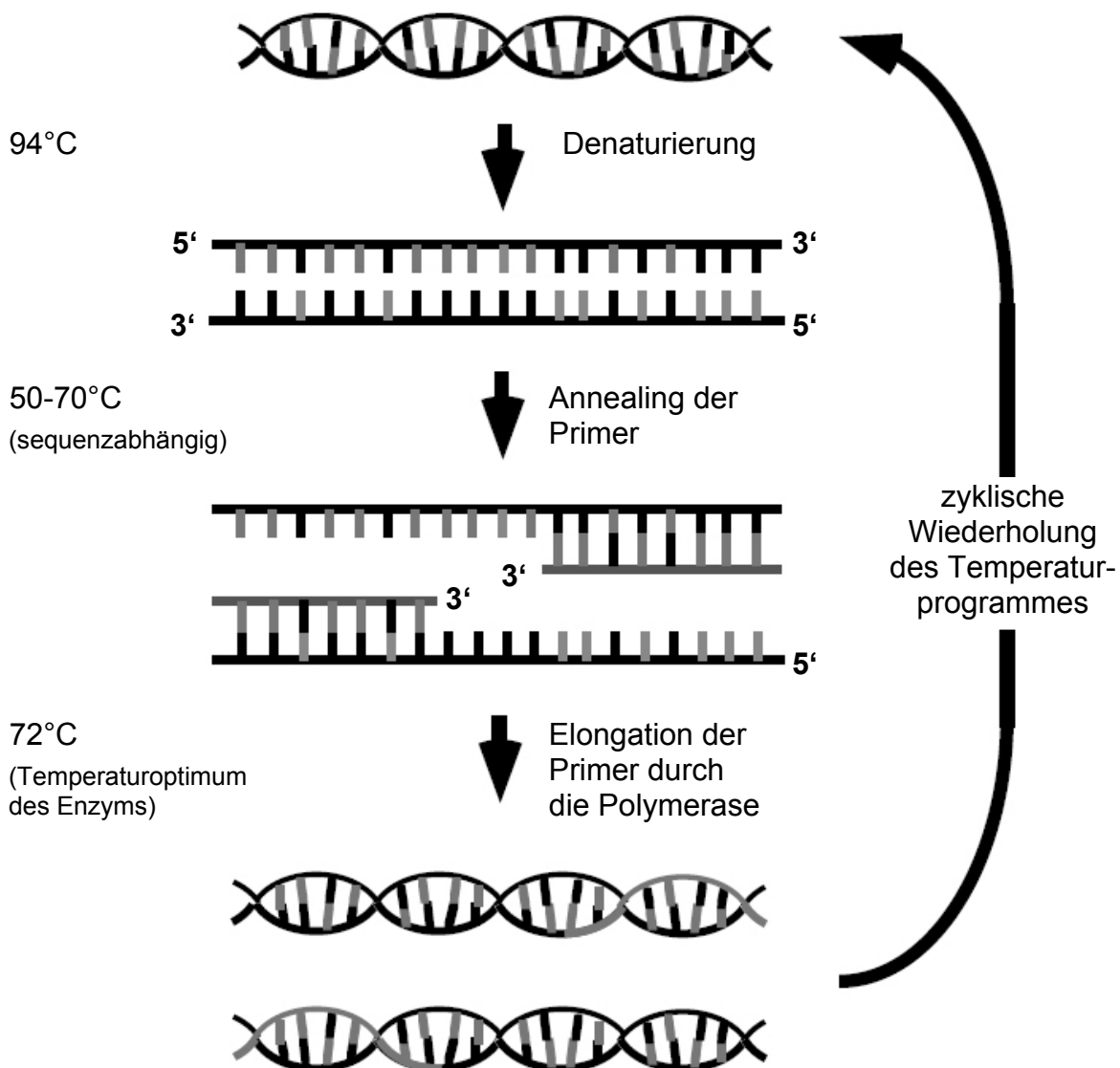


Abb. 9: In der Abbildung werden die einzelnen Reaktionsschritte der PCR schematisch dargestellt. Im oberen Drittel ist die Denaturierungsphase mit den DNA-Einzelsträngen dargestellt, in der Mitte ist die Anlagerung der Primer abgebildet, gefolgt von der Elongationsphase, die im unteren Drittel dargestellt ist.

Da das Elongationsprodukt eines Zyklus als Template für den nächsten Zyklus dienen kann, wird der von den Primern flankierte DNA Abschnitt exponentiell amplifiziert. Theoretisch könnte man in der PCR von einem einzelnen DNA Molekül ausgehen und nach n Zyklen eine Menge von 2^n Molekülen vorfinden.

4.2.4 Reagenzien für die PCR

4.2.4.1 DNA-Polymerase

Realisiert werden konnte die PCR erst mit der Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNA-Polymerase, da durch die hohen Denaturierungstemperaturen die meisten DNA Polymerasen inaktiviert werden. Gefunden wurde diese thermostabile DNA Polymerase in dem Eubakterium *Thermophilus aquaticus*, welches in den heißen Quellen des Yellow Stone National Parks entdeckt wurde. Nach diesem Eubakterium wurde das Enzym Taq-Polymerase genannt.

Diese besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und ist auch bei einer Denaturierungstemperatur von 94°C noch stabil.

Die Syntheseleistung der Taq Polymerase beträgt etwa 1000 Basenpaare (1kb) pro Minute. Die erforderliche Enzymkonzentration für einen 50 µl-Ansatz liegt im Bereich von 0.5-1.5 Units (U) Taq-Polymerase. Eine höhere Enzymkonzentration begünstigt die Nebenproduktbildung.

4.2.4.2 Primer

In der Regel sind die Primer für die PCR zwischen 20 und 30 Nukleotide lang. Nach Möglichkeit sollten alle vier Basen in den Primern gleich häufig vertreten sein. Bereiche mit ungewöhnlichen Sequenzabschnitten aus Polypurin, Polypyrimidin oder sich wiederholenden Motiven sollte man ebenso vermeiden wie Bereiche mit ausgeprägter Sekundärstruktur. Die Primerpaare sollten so beschaffen sein, dass die Sequenzen an ihrem 3'Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sind. Bei Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßnahme besteht die Gefahr, dass sich Primerdimere ausbilden. Diese Artefakte entstehen, wenn die Polymerase den einen Primer komplementär zum anderen Primer oder zu sich selbst synthetisiert.

4.2.4.3 Desoxynukleotide

Die dNTP-Stammlösung wurde durch die Mischung der Nukleotide dGTP, dATP, dCTP und dTTP hergestellt. Besondere Sorgfalt wurde darauf gelegt, dass alle vier dNTP-Moleküle in der gleichen Konzentration vorliegen. Die Stammlösung sollte einen neutralen pH-Wert von 7 aufweisen. Für die PCR setzt man die dNTPs normalerweise in Konzentrationen von etwa 100 μM ein, obwohl die Taq-Polymerase bei niedrigeren dNTP-Konzentrationen präziser kopiert.

4.2.4.4 Puffer

In der PCR kommen verschiedene Puffer zum Einsatz. Diese unterscheiden sich im pH-Wert und in der MgCl_2 -Konzentration. Als optimal für die Aktivität der Taq-Polymerase gilt ein Wert von pH 8.8. Ein saures Milieu wirkt sich negativ auf die Enzymaktivität aus. Die Endkonzentration von MgCl_2 im Reaktionsansatz kann man über einen Bereich von 0.5-5,0 mM variieren. Die Mg^{2+} -Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie Aktivität der Polymerase und erhöhen die Schmelztemperatur sowohl des DNA-Doppelstrangs als auch der Bindung zwischen Primer und Matrize. Die MgCl_2 -Konzentration kann die Spezifität und die Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. Eine ungenügende MgCl_2 -Konzentration verringert die Ausbeute, während überschüssige Mg^{2+} -Ionen die Bildung unspezifischer Produkte fördern.

4.2.5 PCR Optimierung

Um eine möglichst hohe Spezifität und Ausbeute der PCR zu erzielen, müssen die Reagenzien und die PCR-Profil optimal eingestellt werden (Linz und Degenhardt 1990; Innis und Gelfand 1990).

4.2.5.1 Puffer-Optimierung

Der beste Puffer für den jeweiligen SNP wurde aus der in Tab.6 aufgelisteten Optimierungsreihe ermittelt. Die Puffer dieser Testreihe enthalten 300 mM Tris-HCL

und 75 mM Ammoniumsulfat. Der pH-Wert variiert von 8.5-10, die MgCl_2 -Konzentration von 7.5 mM bis 17.5 mM (Abb10).

Tab. 7: Pufferoptimierungsreihe

Puffer	Tris-HCL	NH_4SO_4	PH-Wert	MgCl_2 -Konzentration
A	300 mM	75 mM	8.5	7.5 mM
B	300 mM	75 mM	8.5	10 mM
C	300 mM	75 mM	8.5	12.5 mM
D	300 mM	75 mM	8.5	17.5 mM
E	300 mM	75 mM	9.0	7.5 mM
F	300 mM	75 mM	9.0	10 mM
G	300 mM	75 mM	9.0	12.5 mM
H	300 mM	75 mM	9.0	17.5 mM
I	300 mM	75 mM	9.5	7.5 mM
J	300 mM	75 mM	9.5	10 mM
K	300 mM	7 5mM	9.5	12.5 mM
L	300 mM	75 mM	9.5	17.5 mM
M	300 mM	75 mM	10.0	7.5 mM
N	300 mM	75 mM	10.0	10 mM
O	300 mM	75 mM	10.0	12.5 mM
P	300 mM	75 mM	10.0	17.5 mM

4.2.5.2 Annealing-Temperatur

Die Wahl der optimalen Annealing-Temperatur im Anlagerungsschritt ergibt sich aus der Sequenz der verwendeten Primer und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur. Diese hängt von der Zahl der Basenpaare, dem Anteil an G/C Paaren, der Ionenstärke der Lösung und deren eventuellem Gehalt an Lösungsmitteln (Formamid) ab. Näherungsweise kann die Schmelztemperatur über folgende Formel berechnet werden:

$$T_m = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2] \text{ (in } ^\circ\text{C)}$$

Für die Anlagerung der Primer sollten Temperaturen gewählt werden, die 3-5°C unter der berechneten T_m liegen.

Die ideale Annealing-Temperatur für eine maximale Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt wurde mit dem Thermocycler „Mastercycler Gradient“ ermittelt. Dieses Gerät ermöglicht es, einen Temperaturgradienten von bis zu 10°C, verteilt über den Heizblock, einzustellen.

Diejenige Temperatur, die zu einer optimalen Intensität und Spezifität der Banden führte, wurde für die weiteren Experimente verwendet.

4.2.5.3 Zyklen-Optimierung

Die Anzahl der Zyklen liegt üblicherweise bei 25-35 und sollte 40 nicht überschreiten, da die Aktivität der Taq-Polymerase dann ermüdet und keine exponentielle Amplifikation mehr stattfindet. Außerdem treten unspezifische Amplifikate auf.

4.2.7 Verdau der PCR-Produkte

Die amplifizierten DNA-Fragmente des Grin 1 Gens wurden im Anschluss an die PCR mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease inkubiert. Dieses Enzym schneidet selektiv alle Amplifikate, die eine bestimmte Erkennungssequenz aufweisen. Ergebnis dieses Reaktionsschrittes sind DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung offenbart dann, ob die Restriktionsschnittstelle bei der untersuchten Person vorhanden ist oder nicht.

4.2.8 Agarose Gelelektrophorese

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Migration geladener Moleküle im elektrischen Feld. Aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Gerüsts wandern alle DNA-Fragmente in Richtung der Kathode.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA Molekülen ist umgekehrt proportional dem log₁₀ der Anzahl der Basenpaare bzw. dem Molekulargewicht, d.h., je größer ein DNA-Fragment ist, desto langsamer ist seine Migrationsgeschwindigkeit.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 2.5%igen Agarosegel, wobei als Laufpuffer 0,5 x TBE-Puffer eingesetzt wurde. Für das Gel wurde 2.5 g Agarose

Material und Methoden

in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Zur Sichtbarmachung der Amplifikate wurde den Gelen nach Abkühlung 2 µl Ethidiumbromid je 100 ml Puffer zugesetzt.

Beim Gießvorgang werden durch einen entsprechenden Kunststoffkamm Taschen zum Probenauftrag erzeugt. Jeweils 20 µl der DNA-Proben wurden mit 5 µl eines glyzerinhaltigen Beladungspuffers versetzt, der eine hohe Dichte besitzt und es ermöglicht, die Proben in die Taschen des bereits im Elektrophoresepuffer befindlichen Gels zu unterschichten. Der Ladepuffer enthält außerdem die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol.

Durch diesen kann man zum einen das Auftragen der Probe gut überwachen und zum anderen das Fortschreiten der elektrophoretischen Trennung verfolgen.

Als Größenstandard wurde zusätzlich eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen.

Die Zusammensetzung der DNA-Leiter und der anderen für die Gelelektrophorese verwendeten Reagenzien wird in folgender Tabelle dargestellt:

Tab. 8: Reagenzien der Gelelektrophorese

Reagenzien	Zusammensetzung
DNA-Leiter	100 µl Gene-Ruler Stammlösung (0.5 mg DNA/ml) 166 µl 6 x Loading Dye 734 µl H ₂ O
6 x Loading Dye	1.5 ml Bromphenolblau 1.5 ml Xylencyanol 3.0 ml 30 % ige Glycerol- Lösung 100 µl 0.5 M EDTA- Lösung 5.4 ml H ₂ O
5 x TBE-Puffer	5.4 % Trisbase 2.75 % Borsäure 0.375 % Na ₂ EDTA
Agarose	gebrauchsfertiges Pulver
Ethidiumbromid	gebrauchsfertige Lösung

Die Elektrophorese lief bei einer Gleichspannung von 100 mV für 60 Minuten in einer horizontalen Gelkammer.

Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnten die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe des „Eagle Eye“-Geräts der Firma Stratagene photographiert.

4.3. Die Auswertung der untersuchten Polymorphismen

4.3.1 Der –855G/C Polymorphismus in der 5`UTR des Grin1-Gens

Die Region des Grin1-Gens, die den –855G/C Polymorphismus rs11146020 enthält, wurde mittels PCR amplifiziert.

```
137308678 gggtaaggctctggaaaaggggggcgctgggagcgcattgcgaggggggctggagagggaga
137308738 gaggagcggaagctgaggggtgaaacggctggccccgaacacacctcgcggcgctccagt
137308798 gattcctggtgtccgacctcagccccagtcagtgcggggtccagtttccaggtctctcgcg
137308858 aaggcctggctgagcacatgcggcagccacggtcacccctccctattcctcttagcccgag
137308918 ga[g/c]gggggtcccaagttacatggccacgcagatggggccttctccctcattttctga
137308974 accttgtggggag
```

Abb. 10: Amplifizierte Zielsequenz des –855G/C Polymorphismus rs11146020 (accession number Z 32772)

Die Produktgröße der amplifizierten Zielsequenz des Grin1-Gens beträgt 309 bp. Der untersuchte Basenaustauschpolymorphismus ist grau hervorgehoben. Die fett gedruckten, unterstrichenen Sequenzen veranschaulichen die verwendeten Primer, wobei die Sequenz des nmurtr1 Primers die Basenfolge gggtaaggctctggaaaagg und die des nmurrr1 Primers ctccccacaagggtcagaaa hat.

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Es wurden 50 ng genomische DNA, je 20 pmol der Primer nmurrr1 und nmurtr1 (Sequenz siehe Tab. 8), 1 U *Taq*-Polymerase, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 60 mM Tris-HCl und 15 mM Ammoniumsulfat bei einem pH von 8,5 verwendet. Auf eine anfängliche 5 minütige Denaturierungszeit bei 94°C folgten 35 Zyklen mit je 30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C und 1 min bei 72°C. Danach schloss sich eine Extension von 10 min bei 72°C an.

4.3.1.1 BseRI-Verdau

20 µl des erhaltenen PCR-Produkts wurden mit 4 µl 10 x NEB-Puffer 4.5 U BseRI, PCR-Wasser ad 40 µl versetzt und für 10h bei 37°C inkubiert.

BseRI schneidet spezifisch an der Schnittstelle der Basenfolge 5'-G/AGGAG-3' und 3'-CTCCT/C-5'. Derartige Restriktionsschnittstellen befinden sich an Position –1033 und -855. Findet sich an Position –855 ein C, liegt nur eine adäquate Schnittstelle für BseRI vor. Resultat des BseRI-Verdaus sind in diesem Fall 2 Fragmente der Länge 243bp und 66bp.

Findet sich an dieser Position Guanin, erkennt das Enzym eine weitere Restriktionsschnittstelle. In diesem Fall resultieren aus dem BseRI-Verdau 3 Fragmente der Länge 178 bp, 66 bp und 57 bp. Das G-Allel wird als –855G Allel 2 bezeichnet. Damit ergeben sich die folgenden möglichen Genotypen: Homozygotie für Allel C oder Allel G oder Heterozygotie für Allel C/Allel G.

Folgende Abbildung zeigt beispielhaft ein so erhaltenes Bild nach dem BseRI-Verdau.

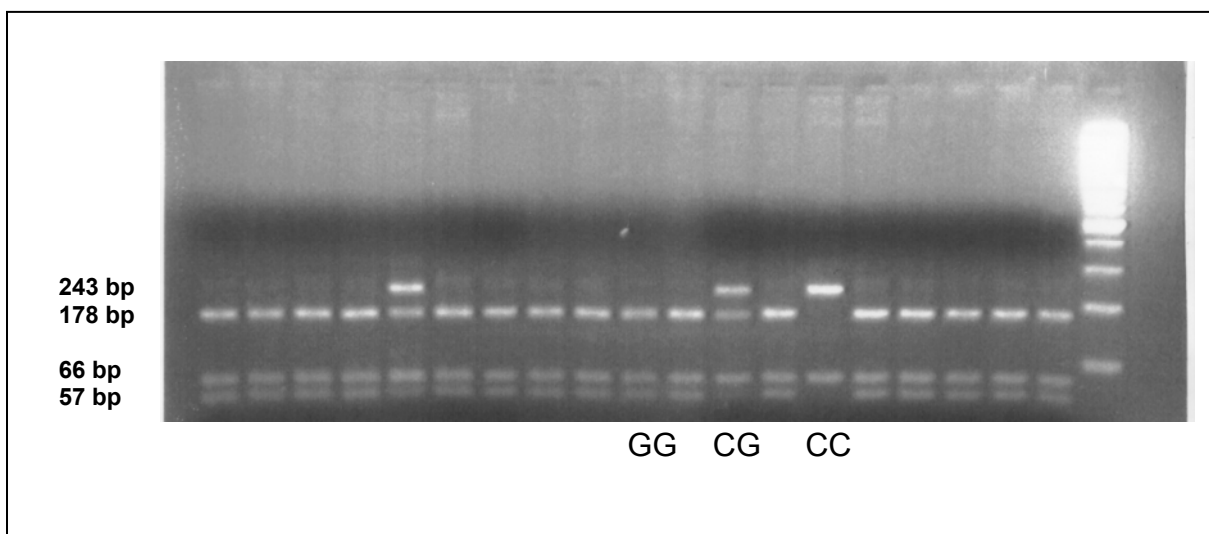


Abb. 11: Auf Agarosegel dargestellter –855G/C-Polymorphismus der 5'UTR des Grin-1-Gens nach BseRI-Verdau

Das C Allel besteht aus den Banden bei 243 bp und 66 bp. Die Banden bei 178 bp, 66 bp und 57 bp stellen das G Allel dar. Der Längenstandard (L) befindet sich am rechten Bildrand.

Material und Methoden

Tab. 9: Darstellung der Genotypisierung des –855G/C Polymorphismus der 5'UTR des Grin1-Gens

Primersequenzen	nmutr1 5'ggg taa ggc tct gga aaa gg 3' nmutr1 5'ctc ccc aca agg ttc aga aa 3'
Ausgangslösungen für die PCR	DNA-Lösung (50 ng/µl) PCR geeignetes Wasser (Fa. Sigma) Taq-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas) 5 x PCR-Puffer B (pH 8,5/Magnesiumchlorid 10.0 mM/Ammoniumsulfat 75 mM/Tris-HCL 300 mM) (Fa. Invitrogen) Sense Primer-Arbeitslösung (10 pmol) (Fa. Life Technologies) Antisense Primer-Arbeitslösung (10 pmol) (Fa. Life Technologies) Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 2.5 mM) (Fa. Amersham Biosciences)
50 µl PCR-Ansatz	20 pmol nmutr1, 20 pmol nmutr1 (2 µl der Arbeitslösung), 50 ng DNA (1 µl), 0.1 mM Desoxynukleotidtriphosphate (2 µl), 1 U Taq (1 µl), 1.5mM Magnesiumchlorid, 15 mM Ammoniumsulfat, 60 mM Tris-HCL, PCR-Wasser ad 50 µl
PCR-Programm	1. Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C 2. 35 Zyklen aus Denaturierung von 30 Sekunden bei 94°C, Annealing von 30 Sekunden bei 56°C, Extension von 1 Minute bei 72°C 3. Abschließende Extension von 10 Minuten bei 72°C
Ausgangslösungen für den Restriktionsverdau	PCR-Produkt BseRI-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (Fa. New England Biolabs) 10 x NEB-Puffer 4 (500 mM Kaliumacetat, 200 mM Tris-Acetate, 100 mM Magnesiumacetat, 10 mM DTT, pH 7.9 bei 25°C) (Fa. New England Biolabs) PCR geeignetes Wasser
Verdaubedingungen	Dauer 10 h bei 37°C
Reaktionsansatz für Verdau	20 µl PCR-Produkt, 5 U BseRI(0,5 µl), 4 µl 10 x NEB-Puffer 4, PCR-Wasser ad 40 µl
Bedingungen für die Gelelektrophorese	2.5% Agarosegel (2.5 g auf 100 ml 0,5 x TBE-Puffer) Laufzeit ca. 1h bei 100 mV

4.3.2 Der 17438 G/A Polymorphismus des Exon 7 des Grin1-Gens

Die Region des Grin-1-Gens, die den 17438G/A-Polymorphismus rs1126442 enthält, wurde mittels PCR amplifiziert. Die folgende Abbildung zeigt die amplifizierte Zielsequenz.

```
137326912 gtgggagtgctggagtcctggcccgctcatccccgtctgccccacagcgaggacgatgctg
137326972 ccactgtataccgcgcagccgcgatgctgaacatgacgggctccgggtacgtgtggctgg
137327032 tcggcgagcgcgagatctcggggaacgccctgcgctacgccccagacggtgagtgctggg
137327192 ccttggcggggtccccgaacggggaggacccccacgggctctgagtcgcatgctcgcttag
137327152 gcatcctcgggctgcagctcatcaacggcaagaacgagtcggccccacatcagcgacgccg
137327212 T[a/g]ggcgtggtggcccaggccgctgcacgagctcctcgagaaggagaacatcaccgac
```

Abb. 12: Amplifizierte Zielsequenz des 17438G/A-Polymorphismus des Exon 7 des Grin1 -Gens (accession number Z32744)

Die Produktgröße der amplifizierten Zielsequenz beträgt 356 bp. Der untersuchte Basenaustauschpolymorphismus ist grau hervorgehoben. Die fett gedruckten, unterstrichenen Sequenzen veranschaulichen die verwendeten Primer, wobei die Sequenz des Primers nm1ex7f4 die Basenfolge gtgggagtgctggagtcct und die des Primers nmex7r4 ggtcggtgatgttctccttc hat.

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt, es wurden 50 ng genomische DNA, 20 pmol von jedem Primer, 1 U *Taq*-Polymerase, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 60 mM Tris-HCl und 15 mM Ammoniumsulfat bei einem pH von 9 verwendet. Auf eine anfängliche zweiminütige Denaturierungszeit bei 94°C folgten 35 Zyklen mit je 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 56°C und 1 min bei 72°C. Danach schloss sich eine Extension von 10 min bei 72°C an.

4.3.2.1 BtgI-Verdau

20 µl des erhaltenen PCR-Produkts wurden mit 4 µl 10xNEB-Puffer 4, 5 U BtgI, PCR-Wasser ad 40 µl versetzt und für 10h bei 37°C inkubiert.

Das Restriktionsenzym BtgI schneidet spezifisch an der Schnittstelle der Basenfolge 5'C/CPuPyGG-3' und 3'GGPyPuC/C. Eine solche Basenfolge befindet sich an Position 17353 des Grin1 Gens. Befindet sich an Position 17438 ein Adenin erkennt das Enzym keine weitere Schnittstelle und es entstehen 2 Fragmente der Länge 212

Material und Methoden

bp und 144 bp. Enthält das Amplifikat an Position 17438 ein Guanin erkennt das Enzym eine weitere Restriktionsschnittstelle und es resultieren drei DNA-Fragmente der Länge 212 bp, 87 bp und 57 bp.

Folgende Abbildung zeigt beispielhaft ein so erhaltenes Bild nach dem BtgI-Verdau.

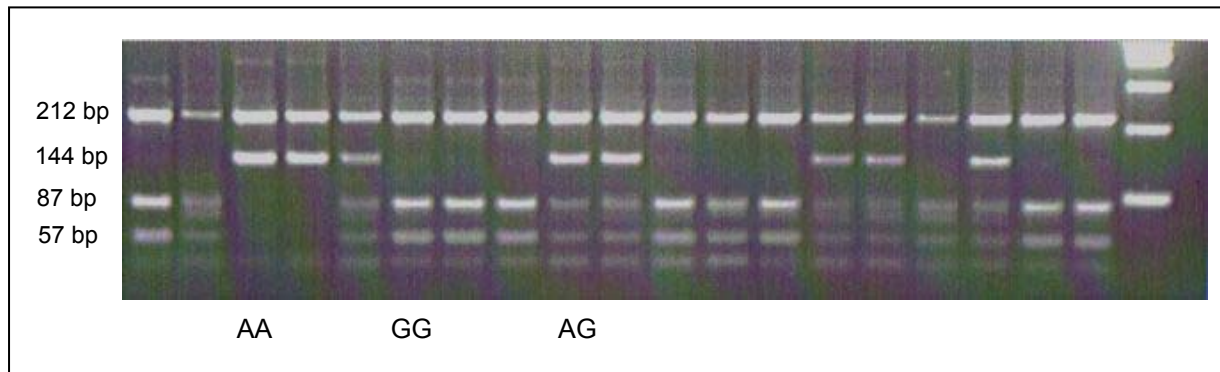


Abb. 13: Auf Agarosegel dargestellter A-17438-G-Polymorphismus des Grin-1-Gens nach BtgI-Verdau

Die Banden bei 212 bp und 144 bp stellen das A Allel dar. Das Bandenmuster bestehend aus den Fragmenten von 212 bp, 87 bp und 57 bp wird als G Allel gewertet. Der Längenstandard (L) befindet sich am rechten Bildrand.

Material und Methoden

Tab. 10: Darstellung der Genotypisierung des 17438 G/A–Polymorphismus des Exon 7 des Grin1-Gens

Primersequenzen	nmex7f4 5'gtg gga gtg ctg gag tcc t 3' nmex7r4 5'ggt cgg tga tgt tct cct tc 3'
Ausgangslösungen für die PCR	DNA-Lösung (50 ng/µl) PCR geeignetes Wasser (Fa. Sigma) Taq-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas) 5 x PCR-Puffer F (PH 9/Magnesiumchlorid 10 mM/Ammoniumsulfat 75 mM/Tris-HCL 300 mM) (Fa. Invitrogen) nmex7f4-Arbeitslösung (10 pmol/µl) (Fa. Life Technologies) nmex7r4-Arbeitslösung (10 pmol/µl) (Fa. Life Technologies) Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 2,5 mM) (Fa. Amersham Biosciences)
50 µl PCR-Ansatz	20 pmol nmex7f4, 20 pmol nmex7r4 (2 µl der Arbeitsslösung), 50 ng DNA (1 µl), 0.1 mM Desoxynukleotidtriphosphate (2 µl), 1U Taq (1 µl), 1.5 mM Magnesiumchlorid, 15 mM Ammoniumsulfat, 60 mM Tris-HCL, PCR-Wasser ad 50 µl
PCR-Programm	1. Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C 2. 35 Zyklen aus Denaturierung von 30 Sekunden bei 94°C, Annealing von 30 Sekunden bei 56°C, Extension von 1 Minute bei 72°C 3. Abschließende Extension von 10 Minuten bei 72°C
Ausgangslösungen für den Restriktionsverdau	PCR-Produkt BtgI-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (Fa. New England Biolabs) 10 x NEB-Puffer 4 (500 mM Kaliumacetat, 200 mM Tris-Acetate, 100 mM Magnesiumacetat, 10 mM DTT, pH 7.9 bei 25°C) (Fa. New England Biolabs) PCR geeignetes Wasser
Verdaubedingungen	Dauer 10 h bei 37 °C
Reaktionsansatz für den Verdau	20 µl PCR-Produkt, 5 U BTG (0,5 µl), 4 µl 10 x NEB-Puffer 4, PCR-Wasser ad 40 µl
Bedingungen für die Gelelektrophorese	2.5% Agarosegel (2,5 g auf 100 ml 0,5 x TBE-Puffer) Laufzeit ca.1 h bei 90 mV

4.4 Statische Auswertung

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS 12.05 Software (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, USA). Die Verteilung der Genotypen wurde auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet. Mittels des zweiseitigen χ^2 -Tests wurden Unterschiede in den Häufigkeiten der Allele und Genotypen bei Patienten und Kontrollen verglichen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ festgelegt, während $p < 0.1$ als Trend gewertet wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse des -855 G/C Polymorphismus der 5'UTR des Grin1-Gens

Der -855 G/C Basenaustauschpolymorphismus der 5'UTR des Grin 1 Gens wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Rice beschrieben und führt zu einer zusätzlichen Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Bse RI (Rice et al. 2001).

Sowohl in der aus 196 Probanden bestehenden Kontrollgruppe, als auch bei den 178 Patienten waren die Genotypen dieses Polymorphismus innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt (Patienten: $F=0.050$, $df=1$, $p=0.526$; Kontrollen: $F=0.134$, $df=1$, $p=0.095$).

5.1.1 Analyse der 5'UTR-Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Allele innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe. Dabei stellt das C-Allel die ungeschnittene Form des Grin1 Gens mit den Fragmenten von 243bp und 66 bp Länge und das G-Allel die geschnittene Form des Grin1-Gens mit Fragmenten von 178 bp 66bp und 57bp Länge nach Bse RI - Verdau dar.

Tab. 11 : Darstellung der Allelverteilung des 5'UTR-Polymorphismus

		5'UTR		Gesamt N
		G-Allel N (%)	C-Allel N (%)	
Gruppe	Kontrollen	354 (90.8)	36 (9.2)	390
	Patienten	318 (89.3)	38 (10.7)	356
Gesamt		672	74	746

Es zeigten sich keine Unterschiede der allelischen Verteilung zwischen Kontrollen und schizophrenen Patienten ($\chi^2=0.434$, OR 1,175 (0.727-1.900), $df=1$, $p=0.510$).

5.1.2 Analyse der 5'UTR-Genotypverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Die möglichen Genotypen für den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismus der 5'UTR des Grin1-Gens wurden folgendermaßen beziffert:

Genotyp 1 = homozygot geschnitten = G/G

Genotyp 2 = Heterozygotie für C/G

Genotyp 3 = homozygot ungeschnitten = C/C

Tabelle 12 gibt die Analyse der Verteilung der Genotypen innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe wieder.

Tab. 12: Darstellung der Genotypverteilung des 5'UTR-Polymorphismus

		5'UTR			Gesamt N
		Genotyp G/G N (%)	Genotyp C/G N (%)	Genotyp C/C N (%)	
Gruppe	Kontrollen	163 (83.6)	28 (14.4)	4 (2.1)	195
	Patienten	142 (79.8)	33 (18.5)	3 (1.7)	178
Gesamt		305	61	7	373

Auch hier konnte keine Assoziation zwischen den jeweiligen Genotypen und Schizophrenie festgestellt werden ($\chi^2=1.226$, $df=2$, $p=0.542$).

Ergebnisse

In Tabelle 13 wurden C-Allelträger (C/G, C/C) in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das G-Allel verglichen.

Tab. 13: Darstellung der Häufigkeit der C-Träger (Genotyp CC und CG) gegen die homozygoten Träger für das G-Allel (Genotyp GG) des Grin1-Gens

		5'UTR		Gesamt N
		Genotyp G/G N (%)	Genotypen C/G und C/C N (%)	
Gruppe	Kontrollen	163 (83.6)	32 (16.4)	195
	Patienten	142 (79.8)	36 (20.2)	178
Gesamt		305	68	373

Auch hier zeigte sich kein Unterschied ($\chi^2=0.908$, OR=1.291 (0.763-2.187, df=1, p=0.341).

In Tabelle 14 wurden dann umgekehrt die Träger des G-Allels (G/G, C/G) in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das C-Allel verglichen.

Tab. 14: Darstellung der Häufigkeit der G-Träger (Genotyp 1 und 2) gegen die homozygoten Träger für das C-Allel (Genotyp 3) des Grin1-Gens

		5'UTR		Gesamt N
		Genotypen G/G und C/G N (%)	Genotyp C/C N (%)	
Gruppe	Kontrollen	191 (97.9)	4 (2.1)	195
	Patienten	175 (98.3)	3 (1.7)	178
Gesamt		366	7	373

Bei dieser Analyse zeigte sich ebenfalls kein Unterschied ($\chi^2=0.068$, OR= 0.819 (0.181-3.709), df=1, p=0.795).

5.2 Analyse des 17438 G/A Polymorphismus des Exon 7 des Grin1-Gens

Der Basenaustauschpolymorphismus von Guanin nach Adenin an Stelle 17438 des Grin1-Gens wurde erstmals von Rice et al. beschrieben und führt zu einer zusätzlichen Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Btg I.

In der Patienten- und Kontrollgruppe, die aus 389 bzw. 229 Personen bestand, waren die Genotypen des Grin1-Gens innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt (Patienten: $F = -0.053$, $df=1$, $p=0.416$; Kontrollen: $F = -0.048$, $df=1$, $p=0.337$).

5.2.1 Analyse der Exon 7-Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Bei der Analyse der Daten zum Grin1-Polymorphismus des Exons 7 wurde zunächst die Verteilung der Allele innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe untersucht. Dabei stellt das A-Allel die ungeschnittene Form des Grin1-Gens mit den Fragmenten von 212 bp und 144 bp Länge und das G-Allel die geschnittene Form des NR1-Gens mit 212 bp, 87 bp und 58 bp langen Fragmenten nach Btg I -Verdau dar. Die Allelverteilung wird in Tabelle 15 veranschaulicht.

Tab. 15: Darstellung der Allelverteilung des 17438 G/A Polymorphismus des Exons 7

		Exon 7		Gesamt N
		G-Allel N (%)	A-Allel N (%)	
Gruppe	Kontrollen	525 (67.5)	253 (32.5)	778
	Patienten	314 (68.6)	144 (31.4)	458
Gesamt		839	397	1236

Es konnte kein Unterschied in den Häufigkeiten der Allele zwischen Patienten- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($\chi^2=0.154$ OR=0.952 (0.743-1.219), $df=1$, $p=0.695$).

5.2.2 Analyse der Exon 7-Genotypverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Die möglichen Genotypen für den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismus des Exons 7 des NR1-Gens wurden folgendermaßen beziffert:

Genotyp 1 = homozygot geschnitten = G/G

Genotyp 2 = Heterozygotie für A/G

Genotyp 3 = homozygot ungeschnitten = A/A

Tabelle 16 zeigt die Genotypfrequenzen in den beiden Gruppen.

Tab. 16: Darstellung der Genotypverteilung des Exon 7 -Polymorphismus des Grin1-Gens

		Exon 7			Gesamt N
		Genotyp G/G N (%)	Genotyp A/G N (%)	Genotyp A/A N (%)	
Gruppe	Kontrollen	173 (44.5)	179 (46.0)	37 (9.5)	389
	Patienten	105 (45.9)	104 (45.4)	20 (8.7)	229
Gesamt		278	283	57	618

Auch in den Genotypfrequenzen war kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkennbar ($\chi^2=0.167$ df=2, p=0.920).

In der nächsten Tabelle (Tab. 17) wurden die A-Allel-Träger (A/G, A/A) in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das G-Allel verglichen.

Tab. 17: Darstellung der Häufigkeit der A-Träger (Genotyp AA und AG) im Vergleich zu den homozygoten Trägern für das G-Allel (Genotyp GG)

		Exon 7		Gesamt N
		Genotyp G/G N (%)	Genotypen A/G und A/A N (%)	
Gruppe	Kontrollen	173 (44.5)	216 (55.5)	389
	Patienten	105 (45.9)	124 (54.1)	229
Gesamt		278	340	618

Es konnte keine Assoziation der Träger des A-Allels mit der Schizophrenie festgestellt werden ($\chi^2=0.111$, OR=0.946 (0.681-1.313), df=1, p=0.739).

Ergebnisse

Tabelle 18 zeigt nun entsprechend die Analyse der Genotypen, indem die Träger des G-Allels (G/G, A/G) in einer Gruppe zusammengefasst und somit gegen die Homozygoten für das A-Allel verglichen wurden.

Tab. 18: Darstellung der Häufigkeit der G-Träger (Genotyp GG und AG) gegen die homozygoten Träger für das A-Allel (Genotyp AA) des Exons 7 des Grin1-Gens

		Exon 7		Gesamt N
		Genotypen G/G und A/G N (%)	Genotyp A/A N (%)	
Gruppe	Kontrollen	352 (90.5)	37 (9.5)	389
	Patienten	209 (91.3)	20 (8.7)	229
Gesamt		561	57	618

Auch für die Träger des G-Allels zeigte sich keine signifikante Häufung für Schizophrenie oder Kontrollen ($\chi^2=0.104$, OR=0.910 (0.515-1.610), df=1, p=0.747).

6 Diskussion

6.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse

Für die vorangestellte Hypothese dieser Arbeit, dass Polymorphismen des NMDAR1-Gens mit Schizophrenie assoziiert sein könnten, lassen sich aufgrund der Untersuchungsergebnisse folgende Aussagen treffen:

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen –855G/C der 5'UTR und 17438G/A des Exon 7 des Grin1-Gens mit der Diagnose Schizophrenie festgestellt werden.

6.1.1 Funktionelle Relevanz der untersuchten Polymorphismen des Grin1-Gens

Rückschlüsse über die funktionelle Relevanz eines SNPs können von dessen Lokalisation innerhalb des Gens gezogen werden.

Der 17438G/A-Polymorphismus im Exon 7 des Grin1-Gens führt zu einem Basenaustausch von Guanin nach Adenin. Bei diesem Marker handelt es sich um eine stille Veränderung, da bisher kein Aminosäureaustausch gezeigt werden konnte. Ein direkter Einfluss dieses Polymorphismus auf die Bioaktivität der NR1-Untereinheit des NMDAR scheint daher unwahrscheinlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese polymorphe Stelle im Kopplungsungleichgewicht mit einem kausalen Schizophrenielokus steht.

Für mehrere SNPs im Promotorbereich, in der sich auch der zweite in dieser Arbeit untersuchte –855G/C-Polymorphismus (rs11146020) befindet, konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass sie einen regulativen Einfluss auf die Genproduktsynthese ausüben können (Passarge 1994).

Begni et al konnten zeigen, dass der Basenaustausch von Guanin nach Cytosin des –855G/C-Polymorphismus der 5'UTR eine Veränderung des ersten Nukleotids der Konsensussequenz für die p50 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-kappaB bewirkt (Begni et al. 2003).

An dieser Konsensussequenz lagern sich sowohl der Transkriptionsfaktor NF-kappa-B, als auch Specificity (SP) Faktoren an (Bai et al. 2003; Hirano et al. 1998).

Die Gruppe der NF-kappa-B Transkriptionsfaktoren besteht aus den Untereinheiten p65 (Rel-A), p50, p52, C-Rel und RelB. Homo- oder Heterodimere des Faktors NF-

Diskussion

kappa-B liegen in nicht stimulierten Zellen in Bindung an einen als I κ B bezeichneten Inhibitor vor. Durch extrazelluläre Stimuli wird diese Bindung aufgehoben und NF-kappa-B aktiviert.

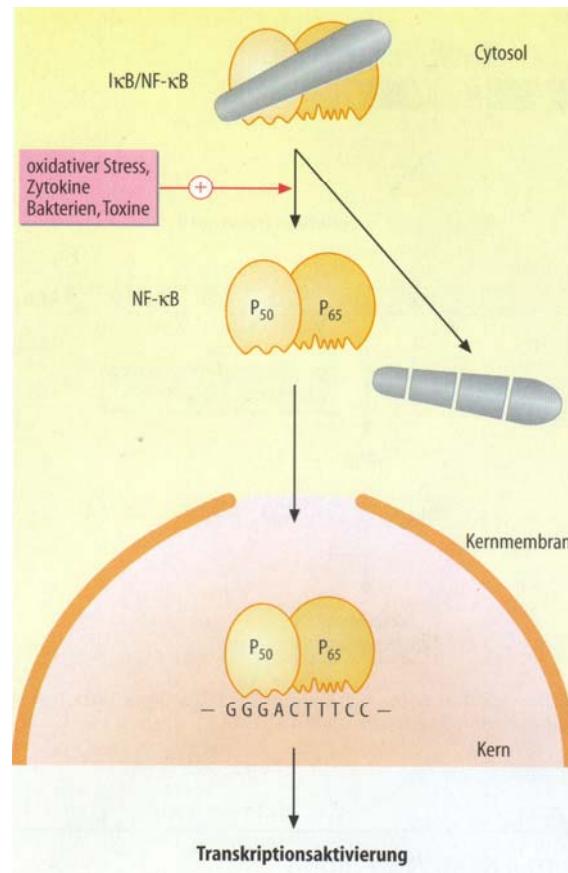


Abb.14: Modell der Aktivierung von NF-kappaB. Das heterodimere NF-kappaB-Protein liegt im Cytosol in Bindung an den Inhibitor I κ B vor. Extrazelluläre Stimuli führen zu einer Veränderung von I κ B, was die Dissoziation des Komplexes, den Abbau von I κ B und die Translokation von NF-kappaB in den Zellkern auslöst (aus Löffler und Petrides 1998)

NF-kappa-B Transkriptionsfaktoren des Nervensystems sind beteiligt am neuronalen Überleben, am Zelltod, der Neuroplastizität und an der Hirnentwicklung (Lipton et al. 1997; Mattson et al. 2000; Kaltschmidt et al. 1995; Kaltschmidt et al. 1994).

Charakteristisch für die Gruppe der SP-Faktoren sind drei Zinkfinger, die die DNA-Bindungsstelle bilden (Suske 1999). Diese Faktoren regulieren die Transkription von Genen sowohl über eine Bindung an GC-Boxen und GT-Motive (Black et al. 2001; Li

et al. 2004), als auch über die Bindung an die NF-kappa-B Konsensussequenz (Liu et al. 2004).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte mittels eines Luciferase-Reporter-Assays gezeigt werden, dass sowohl eine Mutation der NF-kappa-B Konsensussequenz als auch die Zugabe des NF-kappaB-Inhibitors IκB eine signifikante Reduktion der NR1 Promotor Aktivität bewirken (Liu et al. 2004). Außerdem konnten die Proteine Sp1,3 und 4 als Aktivatoren des NR1 Promotors via einer Interaktion mit der NF-kappa-B-Bindungsstelle identifiziert werden (Liu et al. 2004).

Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Mutation im Bereich der NF-kappa-B Konsensussequenz einen Einfluss auf die Transkription des Grin1 Gens hat.

6.1.2 Möglicher Einfluß des C-Allels des –855G/C Polymorphismus der 5`UTR des Grin1-Gens auf die Funktion des NMDA-Rezeptors

Ein funktionsfähiger NMDA-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus mehreren NR1- und zwei oder drei NR2-Untereinheiten. Die NR1-Untereinheit als Bestandteil des Ionenkanals ist essentiell für die Rezeptorfunktion (Moriyoshi et al. 1991). Bestätigen sich die *in vitro* Daten hinsichtlich einer verminderten Expression der NR1-Untereinheit als Folge einer Mutation der NF-kappa-B Konsensussequenz *in vivo* könnte dies zu einer NMDAR-Hypofunktion führen.

Die Auswirkungen einer NMDAR-Hypofunktion auf neurotoxische Vorgänge, die neuronale Entwicklung und die Neuroplastizität, welche mit der Pathologie der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden (Goff und Coyle 2001; Olney und Farber 1995), wurden bereits in der Einleitung dargestellt.

Der potentielle Einfluss des Grin1-Gens auf das glutamaterge System veranlasste zahlreiche Autoren dazu, dieses Gen auf Mutationen und auf eine Assoziation mit der Erkrankung hin zu untersuchen. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die vorhandene Referenzliteratur geben.

6.2 Referenzstudien

6.2.1 Studie von Sakurai et al. 2000

Die tierexperimentellen Ergebnisse von Mohn et al., die einen kausalen Zusammenhang zwischen der verminderten Expression der NR1-Untereinheit und schizophrenen Symptomen belegte, veranlassten Sakurai und Mitarbeiter, schizophrene Patienten auf funktionell relevante Mutationen im Grin1-Gen zu untersuchen (Mohn et al. 1999). Das Mutations-screening erfolgte an 48 Schizophreniepatienten mittels der Einzelstrang-Konformationsanalyse. Die anschließende Assoziationsstudie umfasste je 96 Patienten, die gemäß den Kriterien des DSM-III-R als schizophren klassifiziert wurden und 96 Kontrollen. Alle Studienteilnehmer waren japanischer Abstammung. Die statistische Auswertung ergab eine äußerst geringe Frequenz von 1-3% des jeweils selteneren Allels. In der Kontrollgruppe fehlte eine polymorphe Stelle gänzlich. Für keinen der 4 identifizierten Einzelmarker konnte eine Assoziation mit Schizophrenie nachgewiesen werden, und das steht in Einklang mit den Ergebnissen unserer Studie.

6.2.2 Studie von Rice et al. 2001

Rice et al. führten als erste Forschergruppe ein systematisches Gen-Screening durch, mit dem Ziel, Sequenzveränderungen im Grin1-Gen nachzuweisen. Die Teilnehmer dieser Studie waren US-Amerikaner, die gemäß den Kriterien des DSM-III-R als schizophren klassifiziert wurden. Von den 114 Probanden waren 86 Kaukasier, 16 Afrikaner, 5 Asiaten und 7 amerikanische Ureinwohner. Die untersuchten Regionen beinhalteten alle 22 Exons und die flankierenden intronischen Sequenzen, sowie 1518 bp der 5'UTR und 64 bp der 3'UTR. Es konnten insgesamt 28 verschiedene Sequenzveränderungen identifiziert werden. Von den 25 SNPs waren 8 in der 5'UTR lokalisiert, 6 in codierenden Regionen gelegen und 11 in intronischen Sequenzen. Die übrigen Mutationen waren intronische Deletionen und eine Mikroinsertion/Deletion. In den vom alternativen Splicen betroffenen Exons 5, 21 und 22 konnten keine polymorphen Stellen festgestellt werden. Die Frequenz der Polymorphismen unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen. Für den -855G/C-

Polymorphismus der 5'UTR schwankte die Häufigkeit des selteneren Allels von 6,3% bei Afrikanern bis zu 20% bei Asiaten. Der Polymorphismus 17438G/A im Exon 7 konnte bei Asiaten nicht nachgewiesen werden. Das seltenere Allel lag bei Kaukasiern zu 24,6 % vor, bei amerikanischen Ureinwohnern zu 20% und bei Afrikanern zu 6,7%. Eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit den identifizierten Polymorphismen wurde nicht durchgeführt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, lag auch bei den von Rice et al. untersuchten US-amerikanischen schizophrenen Patienten, das G-Allel bei den Polymorphismen - 855G/C der 5'UTR und 17438G/A des Exon 7 signifikant häufiger vor, als das C-Allel bzw. das A-Allel.

6.2.3 Studie von Hung et al. 2002 an einer taiwanesischen Population

Hung und Mitarbeiter versuchten in dieser Analyse die von Rice (Rice et al. 2001) beschriebenen Einzelmarker im Grin1-Gen in einer taiwanesischen Population nachzuweisen und in einer Fall-Konroll-Studie eine Assoziation mit Schizophrenie zu belegen. Die diagnostischen Kriterien des DSM-IV erfüllten 102 Patienten chinesischer Abstammung. Der Kontrollgruppe gehörten 94 Personen an. Alle 22 Exons und ihre umgebenden intronischen Sequenzen, sowie 1,6kb der 5'UTR wurden mit der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) und Autosequenzierung auf Mutationen hin untersucht. Es konnten nur die 2 Polymorphismen –855G/C und –1140G/A in der 5'UTR identifiziert werden. Die Analyse der Allel- und Genotypenverteilung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Bezogen auf unsere Studie kann man sagen, dass auch in der taiwanesischen Bevölkerung keine Assoziation von Polymorphismen des Grin1-Gens mit Schizophrenie nachgewiesen werden konnte.

6.2.4 Studie von Williams et al. 2002 in Großbritannien

Williams und Mitarbeiter führten an 14 nicht verwandten Schizophreniepatienten mit der denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) (Austin et al. 2000) ein Mutationsscreening der Gene des NMDAR durch. Die anschließende Fall-Kontroll-Studie wurde mit 184 Kontrollpersonen und 184 Patienten, die die Kriterien des DSM-IV erfüllten, durchgeführt. Alle Studienteilnehmer waren in Großbritannien oder Irland geboren und kaukasischer Abstammung. Im Grin1-Gen wurden 5

Einzelmarker genotypisiert. Darunter befanden sich auch die beiden Polymorphismen –855 G/C in der 5'UTR und 17438 G/A im Exon 7 des Grin1-Gens, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die fehlende Assoziation mit Schizophrenie der untersuchten Einzelmarker, darunter auch die beiden SNPs -855 G/C der 5'UTR und 17438 G/A im Exon 7, steht im Einklang mit den eigenen Ergebnissen. Die Studie von Williams et al. liefert aufgrund des ähnlichen Studienaufbaus – annähernd gleiche Anzahl an Teilnehmern, kaukasische Ethnität der Probanden und strenge Indikationsstellung – eine aussagekräftige Bestätigung unserer Ergebnisse.

6.2.5 Studie von Begni et al. 2003 an einer italienischen Population

In dieser Fall-Kontroll-Studie mit Personen kaukasischer Abstammung wurde der Einzelmarker –855G/C in der 5'UTR auf eine Assoziation mit Schizophrenie untersucht. Von den 139 Patienten litten nach den Kriterien des DSM-IV 26 an einer schizoaffektiven Störung. Die Kontrollgruppe umfasste 145 Personen. Sowohl die Allel-Frequenz als auch die Genotypenverteilung zeigte signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Das C-Allel lag etwa doppelt so häufig in der Patienten- als in der Kontrollgruppe vor. Diese zu unserer Studie widersprüchlichen Resultate könnten u.a. durch die Einbeziehung von schizoaffektiven Patienten bedingt sein.

6.2.6 Studie von Martucci et al. 2003 an einer kanadischen Population

Martucci und Mitarbeiter unternahmen einen Replikationsversuch an einer kanadischen Population mit mehrheitlich kaukasischer Abstammung. Die Studie umfasste 86 Familien-Trios sowie 91 Patienten und 91 Kontrollpersonen. Alle Patienten erfüllten die diagnostischen Kriterien des DSM-IV. Eine Assoziation der beiden untersuchten Einzelmarker in der 5'UTR und im Exon 7 mit Schizophrenie konnte nicht nachgewiesen werden. Für den Polymorphismus –855G/C in der 5'UTR des Grin1-Gens konnte lediglich ein Trend für das G-Allel mit einem p-Wert von 0.14 gezeigt werden. Des Weiteren ergab die 2 Marker-Haplotypenanalyse eine grenzwertige Assoziation. Bezogen auf die vorliegende Arbeit kann man sagen, dass die gemischte ethnische Abstammung der von Martucci et al. untersuchten

Probanden die Gefahr einer Populationsstratifikation birgt, und die Ergebnisse deshalb nur bedingt mit unseren Daten verglichen werden können. Die statistische Aussagekraft dieser Studie mit 91 Teilnehmern ist ebenfalls deutlich geringer, als in unserer Studie.

6.2.7 Studie von Tani et al. 2002 an einer japanischen Population

In dieser Fall-Kontroll-Studie wurde die Promotorregion des Grin1-Gens auf Einzelmarker hin untersucht. Die 194 Patienten und 216 Kontrollpersonen waren japanischer Abstammung. Die Kriterien des DSM-IV wurden für die Diagnosestellung herangezogen. Von den 17 identifizierten Einzelmarkern konnten nur fünf sowohl in der Patienten-, als auch der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Unter diesen befand sich auch der Polymorphismus an Position –855 G/C in der 5'UTR. Die statistische Auswertung ergab, übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit, keine Assoziation dieser Einzelmarker mit Schizophrenie.

6.2.8 Studie von Paus et al. 2004 an einer deutschen Population

Paus und Mitarbeiter führten ein systematisches Screening des Grin1-Gens durch, mit dem Ziel, DNA-Sequenzveränderungen in einer deutschen Population zu identifizieren. Die 46 untersuchten schizophrenen Patienten erfüllten die Kriterien des DSM-III-R. Die Kontrollgruppe bestand aus 54 Personen gemischter ethnischer Abstammung. Mit der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) gelang der Nachweis von 4 Basenaustauschpolymorphismen. Der Vergleich der Allelfrequenzen und Genotypenverteilung des Einzelmarkers 17438G/A des Exons 7 sowie der übrigen SNPs ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse unserer Studie. Bezogen auf unsere Studie ist die statistische Aussagekraft der Studie von Paus et al. mit nur 46 Patienten jedoch deutlich geringer.

6.2.9 Studie von Qin et al. 2005 an einer chinesischen Population

Qin und Mitarbeiter versuchten in dieser Analyse, die Ergebnisse zu Einzelmarkern des Grin 1- und Grin 2-Gens in einer chinesischen Population zu replizieren. Weiteres Ziel war die Identifikation genetischer Wechselwirkungen zwischen den Genen der NMDAR-Untereinheiten. Die Gruppe der Studienteilnehmer umfasste 393 Personen, von denen 253 gemäss den Kriterien des DSM-IV eine Schizophrenie diagnostiziert wurde. Der Kontrollgruppe gehörten die übrigen 140 Probanden an.

Für die Studie wurden Einzelmarker verwendet, die bereits publiziert waren. Das Grin 1-Gen wurde auf 11 Einzelmarker hin untersucht, wobei nur einer in dieser Population vorhanden war. Der andere in der vorliegenden Arbeit untersuchte SNP 17438G/A des Exons 7 lag in dem untersuchten Kollektiv nicht vor. Im Grin2B- Gen konnten 4 SNPs identifiziert werden. Für den Einzelmarker des Grin1-Gens rs11146020 konnte keine Assoziation mit Schizophrenie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit unserer Studie. Die 3-Einzelmarker-Haplotypenanalyse des Grin2B-Gens zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Die statistische Auswertung eines 3-Marker-Models, bestehend aus den SNPs -855 G/C der 5'UTR des Grin1-Gens und zwei Markern des Grin2B-Gens, zeigte bei der Verteilung der Genotypen signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Mittels der *multifaktor-dimensionality reduction* (MDR) Methode konnten Qin et al. eine signifikante genetische Wechselwirkung zwischen dem auch in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismus -855G/C des NMDAR1-Gens und den Polymorphismen T4197C und T5988C des NMDAR2B Gens nachweisen.

Abschließend kann man sagen, dass die Studie von Qin et al. die eigenen Daten bestätigt, wobei der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Grin2B-Gens und dessen Interaktion mit dem Grin1-Gen liegt.

6.2.10 Studie von Zhao et al. 2006 an einer chinesischen Population

Zhao und Mitarbeiter führten eine kombinierte Fall-Kontroll und familienbasierte-Studie an einer Population von Han Chinesen durch. Für die Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurden 707 Patienten mit einem und 689 Kontrollpersonen untersucht. Für die TDT-Studie wurden 353 Patienten und ihre biologischen Eltern rekrutiert. Die Diagnosestellung erfolgte durch zwei unabhängige Psychiater gemäß den Kriterien des DSM-III-R.

Es wurden 7 SNPs und ein Mikrosatellit im Grin1-und Grin 2A-Gen genotypisiert.

Die Auswertung der Allelverteilung der Fall-Kontroll-Studie erbrachte eine Assoziation mit Schizophrenie für vier Einzelmarker des Grin1-Gens. Die Stärkste zeigte der auch in dieser Arbeit untersuchte SNP rs11146020, bei dem ein signifikant häufigeres Vorkommen des G-Allels bei Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen vorlag. In der Genotypenverteilung konnte für diesen Einzelmarker ebenfalls eine Assoziation mit der Erkrankung nachgewiesen werden.

Auch die familienbasierte Studie erbrachte für diesen SNP ein signifikant häufigeres Vorkommen des G-Allels bei Schizophreniepatienten.

Die Haplotypenanalyse ergab für alle Haplotypen, die den Einzelmarker rs11146020 enthielten eine Assoziation mit Schizophrenie, wobei diese am stärksten bei dem 2 Marker-Haplotyp rs11146020- rs2301363 ausgeprägt war.

Die 4 in der 5'UTR lokalisierten Einzelmarker rs6560665, rs11146020, rs2301363 und hCV1840191 befanden sich außerdem im starken Kopplungsungleichgewicht.

Um den Anteil des SNP rs11146020 an der Assoziation herauszufinden, wurde eine Multilokus-Assoziationsanalyse mit den 3 übrigen Einzelmarkern rs6560665, rs2301363 und hCV1840191 durchgeführt. Das negative Resultat dieser Analyse und die Tatsache, dass in der Umgebung des SNP rs11146020 keine weiteren polymorphen Stellen vorlagen, werteten Zhao und Mitarbeiter als Beweis, dass die Assoziation der 5'UTR des Grin1-Gens mit der Erkrankung hauptsächlich von diesem Einzelmarker herrührt.

Verglichen mit der vorliegenden Arbeit bestehen zwischen beiden Studien erhebliche Diskrepanzen, die kausal für die konträren Resultate sein könnten.

Bezogen auf unsere Studie ist zwar die Anzahl der Studienteilnehmer deutlich grösser, das Durchschnittsalter der chinesischen Kontrollen ist aber deutlich unter

dem der Patienten. Auch die unterschiedliche ethnische Abstammung der jeweiligen Studienteilnehmer erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Tab. 19 gibt eine Übersicht über die untersuchten SNPs des Grin1-Gens. Die beiden untersuchten SNPs, sowie SNPs, die eine Assoziation mit Schizophrenie aufwiesen sind fett hervorgehoben.

SNP (Lokalisation)	Zhao	Williams	Paus	Begni	Hung	Martucci	Qin	Sakurai
rs6560665 (5'UTR)	x				x			
rs11146020 (5'UTR)	x	x		x	x	x	x	
rs2301363 (Intron1)	x							
hCV1840191 (Intron2)	x							
rs10870196 (Intron2)		x						x
rs1126430 (Exon3)								x
rs1126435 (Exon5)								x
rs6293 (Exon5)		x	x			x		
rs1126442 (Exon7)		x	x					
rs10747050 (Intron10)		x	x					
rs11146026 (Intron10)	x		x					
rs2071644 (Intron 18)								x

6.3 Abschließende Beurteilung der untersuchten Einzelmarker im Kontext der Literatur

Die These, dass das Grin1-Gen an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sein könnte stützt sich hauptsächlich auf pharmakologische- und Tiermodelle der Schizophrenie sowie neurochemische Befunde, wie bereits in der Einleitung erwähnt. In älteren Kopplungsanalysen konnte eine schwache Assoziation dieses Locus mit Schizophrenie nachgewiesen werden. In den Metanalysen von Levinson und Badner konnten diese Ergebnisse jedoch nicht repliziert werden.

Durch ein systematisches Mutations-Screening des Grin1-Gens konnte Rice 28 SNPs bzw. Deletionen/Insertionen identifizieren (Rice et al. 2001).

Die Ergebnisse der nachfolgenden Fall-Kontroll-Assoziationstudien zu Einzelmarkern des Grin1-Gens waren jedoch meist negativ oder widersprüchlich.

Bisher konnte nur zwei Studien eine Assoziation des Polymorphismus –855G/C der 5'UTR des Grin1–Gens mit Schizophrenie nachweisen (Begni et al. 2003; Zhao et al. 2006). Die Ergebnisse dieser beiden Analysen sind jedoch widersprüchlich. Während in der italienischen Studie (Begni et al. 2003) eine Assoziation des C-Allels mit der Erkrankung beschrieben wurde, war dies in der Studie von Zhao et al. für das G-Allel der Fall (Zhao et al. 2006). In den übrigen Studien konnte, wie auch in der vorliegenden Studie, kein signifikanter Unterschied in der Allel- und Genotypverteilung zwischen Kontrollen und Patienten festgestellt werden (Qin et al. 2005; Martucci et al. 2003; Tani et al. 2002; Williams et al. 2002; Hung et al. 2002). Die Ergebnisse der Haplotypenanalysen zu diesem Einzelmarker ergaben übereinstimmend eine Assoziation mit Schizophrenie, wobei diese in der Studie von Martucci mit $p=0,049$ nur schwach ausgeprägt ist (Zhao et al. 2006; Martucci et al. 2003).

In den Referenzstudien zum Polymorphismus 17438 G/A des Exon 7 des Grin1-Gens konnte übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit keine Assoziation mit Schizophrenie nachgewiesen werden (Paus et al. 2004; Williams et al. 2002). Die Genotypisierung dieses Einzelmarkers misslang bei allen Studien mit Teilnehmern asiatischer Abstammung.

Mögliche Ursachen für fehlgeschlagene Replikationsversuche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse sollen im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

6.3.1 Ätiologische Heterogenität der Erkrankung

Nach dem derzeitigen Wissensstand handelt es sich bei der Schizophrenie um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, deren Phänotyp durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen hervorgerufen werden kann.

In Familienstudien konnte gezeigt werden, dass der stärkste prädisponierende Faktor die genetische Belastung ist, dessen Einfluss an der Ätiologie der Schizophrenie auf 45-75% geschätzt wird (Kendler und Gardner 1997; Cannon et al. 1998; Franzek und Beckmann 1996). Eine nur etwa 50%ige Konkordanz für Schizophrenie bei monozygoten Zwillingen verdeutlicht aber auch den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Pathogenese.

Zu diesen zählen wie bereits erwähnt Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft, Infektionen des Gehirns während der Kindheit, Drogenkonsum in der Jugend und Adoleszenz und das Aufwachsen in Großstädten.

Der Einfluss und die Art dieser Umweltfaktoren könnte je nach untersuchter Population variieren und dadurch die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse vermindern. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass diese genetische Effekte abmildern, verstärken oder überdecken.

6.3.2 Ethnische Abstammung

Ursächlich für die Widersprüche in der Referenzliteratur und für die Fehlschläge bei der Genotypisierung der in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen in anderen Studien könnte die unterschiedliche ethnische Abstammung der jeweiligen Studienteilnehmer sein. Rice und Mitarbeiter berichteten, dass die Allelverteilung der identifizierten SNPs des Grin1-Gens je nach ethnischer Zugehörigkeit stark variiert (Rice et al. 2001). Resultate von Studien mit Teilnehmern heterogener ethnischer Abstammung sind deshalb kritisch zu bewerten, da diese Populationsstratifikation zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen kann (Schaid und Sommer 1993; Lander und Schorck 1994). Diese Einschränkung trifft auf die kanadische Studie von Martucci mit Probanden gemischter ethnischer Abstammung zu, in der ein trendmäßig häufigeres Vorkommen des G-Allels des –855G/C Polymorphismus der 5'UTR bei Patienten berichtet wird (Matucci et al. 2003). Der Umstand, dass bei Kaukasiern das C-Allel (Begni et al. 2003) und bei Asiaten das G-Allel (Zhao et al. 2006) signifikant häufiger bei Patienten vorliegt, könnte zu einer Egalisierung der Allel-Frequenzen zwischen Patienten und Kontrollen geführt haben.

Die widersprüchlichen Ergebnisse zum –855G/C Polymorphismus der 5'UTR zwischen den Studien von Begni und Zhao könnten durch das unterschiedlich häufige Vorkommen des C-Allels in der allgemeinen kaukasischen und chinesischen Bevölkerung bedingt sein. In der Studie von Begni lag das C-Allel bei 8,6% der Kontrollpersonen vor, im Vergleich zu 21,6 % bei Zhao. In unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich in der kaukasischen Bevölkerung außerdem ein weiterer SNP, rs7032504, mit einer Frequenz des selteneren Allels von etwa 30%, der in der chinesischen Bevölkerung nicht vorhanden ist. Dieses könnte eventuell als

protektives Allel fungieren und die Wirkung des Risikoallels beeinflussen oder sogar aufheben. Dieser Mechanismus konnte bereits bei SNPs des P-selektin-Gens, das mit dem Myokardinfarkt assoziiert wird, nachgewiesen werden (Tregouet et al. 2002). Das Fehlen einer polymorphen Stelle an Position 17438 des Grin1-Gens in den vorliegenden asiatischen Studien könnte durch Selektionsvorgänge im Laufe der menschlichen Evolution bedingt sein. Da Kaukasier und Asiaten über Jahrtausende fast isoliert voneinander lebten ist anzunehmen, dass sich diese Vorgänge in beiden ethnischen Gruppen unabhängig voneinander vollzogen haben, und deshalb im Grin1-Gen die Anzahl und Lokalisation der SNPs je nach untersuchter Population variiert.

6.3.3 Studiendesign

Die angeführten Referenzstudien unterschieden sich erheblich in der Auswahl und Anzahl der Studienteilnehmer sowie in den Mutationsscreening-Methoden.

Problematisch hinsichtlich der Vergleichbarkeit der einzelnen Studien könnte die teilweise unzureichende Repräsentativität des ausgewählten Kollektivs der Kontrollpersonen und der Erkrankten sein. Teilweise manifestiert sich die schizophrene Symptomatik erst im höheren Lebensalter, so dass grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass Probanden der Kontrollgruppe zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls erkranken werden. Um Spätmanifestationen innerhalb des Kontrollkollektivs weitgehend auszuschließen ist es deshalb günstig ein relativ hohes Durchschnittsalter dieser Gruppe zu wählen. Das mit 46 Jahren deutlich höhere Durchschnittsalter der Patienten im Vergleich zu 34 Jahren der Kontrollen könnte bei der Studie von Zhao und Mitarbeitern, die eine Assoziation von mehreren SNPs mit Schizophrenie berichten, eine Rolle spielen.

Von großer Bedeutung für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studienergebnisse ist eine enge Diagnosestellung bei der Rekrutierung des Patientenkollektivs. Denn bei einer weiten Auslegung des Schizophreniebegriffs sind mindestens 15-20% der diagnostizierten Psychosen den schizoaaffektiven Störungen zuzurechnen (Marneros et al. 1991). Außerdem ist auf eine differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen organischen und nichtorganischen sowie substanzinduzierten Störungen zu achten. Im Gegensatz zur Untersuchung von Zhao et al. wurden in der Studie von Begni et al., in der ebenfalls eine Assoziation des Grin1-Gens mit Schizophrenie gezeigt

werden konnte, Patienten mit schizoaffectiven Störungen eingeschlossen. Studien zum Vorkommen des C-Allels des -855G/C-Polymorphismus der 5'UTR des Grin1-Gens bei schizoaffectiven Patienten liegen bisher nicht vor. Da eine gemeinsame genetische Grundlage für beide Erkrankungen postuliert wird (Maier et al. 1999), ist nicht abschließend zu klären, ob der Einschluss dieser Patienten das Studienergebnis beeinflusst.

Die statistische Aussagekraft der einzelnen Referenzstudien variiert stark aufgrund der Anzahl der untersuchten Patienten, die sich zwischen 46 und 707 bewegte. Ein zu kleines Studienkollektiv ist besonders problematisch, wenn Marker untersucht werden, die sehr häufig oder nur selten in der allgemeinen Bevölkerung vorkommen oder bei denen nur eine geringe Häufigkeitsdifferenz zwischen Patienten und Kontrollen vorliegt. Die Häufigkeit des G-Allels des -855 G/C Polymorphismus schwankte je nach Studie zwischen 80-90%. Beim 17438 G/A Polymorphismus des Exon 7 lag das G-Allel bei etwa 70% der untersuchten Personen vor.

Bei einer angenommenen Häufigkeit des untersuchten Markers von 90% beträgt die erforderliche Studiengröße je 175 Kontrollen und 175 Patienten um mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% und einem Signifikanzniveau mit $p=0.05$ ein relatives Risiko von mindestens 5 auch tatsächlich zu detektieren. Die Fallzahlen von 178 Patienten für den SNP -855G/C der 5'UTR bzw. 229 für den SNP 17438 G/A des Exon7 in der vorliegenden Studie sind somit ausreichend, um eine eventuell vorhandene Assoziation mit der Schizophrenie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch nachzuweisen. Die deutlich geringeren Fallzahlen von 46 (Paus et al. 2004), 91 (Martucci et al. 2003), 102 (Hung et al. 2003) und 139 Patienten (Begni et al. 2003) in einigen Referenzstudien könnten daher ursächlich für falsch positive oder negative Ergebnisse sein.

Beteiligt an der spärlichen Datenlage zum 17438G/A Polymorphismus des Exon 7 dürfte auch die jeweils gewählte Mutationsscreening-Methode haben.

Das Mutationsscreening erfolgte in den meisten Studien durch die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) Analyse (Paus et al. 2004; Hung et al. 2002; Sakurai et al. 2000). Die Sensitivität dieses Verfahrens von maximal 85% könnte ursächlich für die fehlende Identifikation einiger Mutationen des Grin1-Gens in diesen Studien sein. Methoden mit größerer Sensitivität wie die denaturing high-performance Flüssigkeits-Chromatographie oder der direkten Sequenzierung kamen nur in wenigen Studien zur Anwendung (Williams et al. 2002).

6.3.4 Gen-Gen Interaktionen

Nach dem derzeitigen Wissensstand handelt es sich bei der Schizophrenie um eine komplexe Erkrankung, bei der eine polygene Übertragung mit mehreren beteiligten Genen angenommen wird, von denen jedes nur einen kleinen Teil zum Erkrankungsrisiko beiträgt. In den vergangenen Jahren konnten in Assoziations- und Kopplungsstudien zahlreiche Vulnerabilitätsgene an verschiedenen Genorten identifiziert werden. Positive Ergebnisse liegen neben den Genen Grin1 und Grin2, die für NMDAR-Untereinheiten codieren auch für die NMDAR modulierenden Gene G72 und DAO vor. Weitere Kandidatengene für Schizophrenie sind die Gene Neuregulin 1 und Dysbindin. Neuregulin spielt eine wichtige Rolle bei der Expression und Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie dem NMDA-Rezeptor (Stefansson et al. 2002).

Der Dystrophin-Protein-Komplex, an den das Dysbindin Protein bindet, ist als Bestandteil des Cytoskeletts an der Synapsenbildung und wahrscheinlich auch an der Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors beteiligt (Benson et al. 2001). Eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung wurde außerdem für das Prolin-Dehydrogenase (PRODH) Gen, das Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Gen und Regulator-of-G-Protein-Signaling-4 (RGS4) Protein berichtet. Komplettiert werden die Befunde durch positive Ergebnisse für Gene des dopaminergen Systems, das schon lange mit Schizophrenie assoziiert wird, und eng mit dem glutamatergen System gekoppelt ist.

Da bisher kein Hauptgen identifiziert werden konnte ist es naheliegend, dass nicht einzelne SNPs innerhalb eines Gens, sondern das Zusammenspiel verschiedener Varianten einen Einfluss auf den Phänotyp hat.

In zahlreichen Gen-Gen Interaktionsstudien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Wechselwirkungen zwischen multiplen Genen bei der Pathogenese komplexer Erkrankungen wie essentiellem Bluthochdruck, Brustkrebs, Diabetes mellitus Typ II und Vorhofflimmern eine entscheidende Rolle spielen (Ritchi et al. 2001; Cho et al. 2004; Moore et al. 2002; Tsai et al. 2004).

Die Ergebnisse der Studie von Qin et al, die eine signifikante genetische Interaktion zwischen Polymorphismen der Gene Grin1 und Grin2B ergaben, deuten darauf hin, dass auch bei Schizophrenie Interaktionen der verschiedenen Vulnerabilitätsgene an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind.

6.4 Ausblick

Bisher konnten keine eindeutigen molekulargenetischen Beweise erbracht werden, dass das Grin1-Gen an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt ist. Die bisherigen Ergebnisse sind entweder negativ, wie in der vorliegenden Studie oder inkonsistent. Die zentrale Rolle des NMDAR innerhalb des glutamatergen Systems und seine Beteiligung an der Hirnentwicklung, der Neuroplastizität und neurotoxischen Vorgängen lassen seine Gene jedoch weiterhin als interessante Suszeptibilitätsgene erscheinen.

Der zweifelsfreie Nachweis einer Beteiligung des Grin1-Gens an der Pathogenese der Schizophrenie muss das Ziel weiterer Studien sein. Hierbei ist auf eine ausreichend große Stichprobengröße zu achten, um auch statistisch aussagekräftige Ergebnisse bei seltenen Allelen oder Genotypen zu erhalten. Die Untersuchungen sollten möglichst mit Probanden gleicher ethnischer Abstammung durchgeführt werden, da die Allel- und Genotypverteilung je nach ethnischer Abstammung zum Teil stark variiert. Außerdem ist auf eine enge Diagnosestellung zu achten, um schizoaffektive Patienten und Patienten mit anderen psychiatrischen Erkrankungen auszuschließen.

In den meisten vorliegenden Studien wurden nur isoliert einzelne SNPs innerhalb des GRIN1-Gens untersucht. Nach derzeitigem Wissensstand beinhaltet das GRIN1-Gen 93 polymorphe Stellen, von denen zahlreiche im Kopplungsungleichgewicht stehen und deshalb aus statistischer Sicht nicht unabhängig voneinander zu werten sind (Zhao et al. 2006).

Der Einfluss eines einzelnen SNPs ist oft quantitativ gering und wird erst in Wechselwirkung mit anderen SNPs deutlich.

Die in vitro Analyse einzelner SNPs hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz muss deshalb kritisch gewertet werden, wenn noch weitere Polymorphismen im selben Gen die Funktionalität in vivo beeinflussen könnten. Denkbar wäre eine additive Wirkung mehrerer SNPs aber auch das Vorliegen von protektiven Allelen. Die Haplotypanalyse berücksichtigt dieses Zusammenspiel von möglichen Einzelmarkern innerhalb eines Gens und verbessert die Aussagekraft über mögliche Interaktionen oder deckt sie erst auf. Die getrennte Untersuchung einzelner SNPs könnte deshalb kausal für Fehlinterpretationen und für die häufige Nichtreproduzierbarkeit von genetischen Studien für komplexe Erkrankungen wie der Schizophrenie sein.

Bekräftigt wird diese These durch die Identifikation mehrerer Risikohaplotypen in einer asiatischen Population (Zhao et al. 2006). Eine Replikation dieser Ergebnisse in einer Studie mit Patienten kaukasischer Abstammung steht noch aus.

Da bisher kein Hauptgen für die Erkrankung bekannt ist, liegt die Vermutung nahe, dass die bisher identifizierten Vulnerabilitätsgene nicht miteinander konkurrieren sondern eher ein Zusammenspiel derselben besteht. Die Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen multiplen Genen bei der Pathogenese komplexer Erkrankungen eine Rolle spielen, konnte bereits bei zahlreichen Erkrankungen wie essentiellem Bluthochdruck, Brustkrebs, Diabetes mellitus Typ II und atrial fibrillation nachgewiesen werden (Ritchi et al. 2001; Cho et al. 2004; Moore et al. 2002; Tsai et al. 2004).

In zukünftigen Studien sollten deshalb nicht nur Marker innerhalb eines Gens sondern vermehrt Gen-Gen-Interaktionen untersucht werden. Neben den Genen Grin1 und Grin2B des NMDAR, für die bereits eine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Qin et al. 2005) stellen die Gene NRG1, DNTBP1, PROHD, DAAO und G72, die modulierend auf die Glutamat-Aktivität bzw. den NMDAR wirken, interessante Kandidaten dar für weitere Gen-Gen-Interaktionsstudien.

Stark erschwert wird die molekulargenetische Erforschung der Ätiologie schizophrener Psychosen durch die Heterogenität der Erkrankung.

Der Versuch, durch eine klinisch-psychopathologische Subtypisierung der schizophrenen Psychosen eine ätiologische Homogenisierung zu erreichen, führte nicht zum Erfolg.

Ein alternativer Ansatz um dieses Ziel zu erreichen wurde mit der Erfassung sogenannter Endophänotypen entwickelt. Während klassische Phänotypen durch Verhaltensmerkmale oder Krankheitsdiagnosen definiert werden, repräsentieren Endophänotypen neurobiologische Krankheitskorrelate des Gehirns.

Der Vorteil des Endophänotyps liegt in einer einfacheren genetischen Determination und in einer direkteren Beeinflussung durch die Krankheitsgene. Diese Vorgehensweise erhöht die Sensitivität und Spezifität von Studienergebnissen, da Erkrankungsfälle zusätzlich einen spezifischen Endophänotyp tragen müssen und andererseits auch klinisch gesunde Träger des Endophänotyps als „erkrankt“ gelten. Langfristiges Ziel der molekulargenetischen Forschung ist die individuelle Therapie der Patienten und im günstigsten Fall die Einleitung von Präventivmaßnahmen bei Trägern von Risikoallelen oder bestehender familiärer Vorbelastung. Dieses Ziel

Diskussion

kann aber nur erreicht werden, wenn es gelingt, die funktionellen Auswirkungen von Risikoallelen- und Haplotypen auf die Genfunktion und auf die Eigenschaften der exprimierten Proteine zu entschlüsseln. Falls es in nachfolgenden Studien gelingt, einen eindeutigen Nachweis zu erbringen, dass der Polymorphismus -855 der 5'UTR des Grin1-Gens mit Schizophrenie assoziiert ist und eine reduzierte Expression der NR1-Untereinheit als Folge dieses Basenaustauschs gezeigt werden kann, könnte die Substitution der NR1-Untereinheit ein Baustein in der Schizophrenietherapie werden.

7 Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis

A	Adenosin
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazol
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
B	Blindprobe
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
cM	Centimorgan
COMT	Catechol-O-methyltransferase
C-Terminus	Carboxy-Ende
CREB	Cyclic AMP response element-binding protein
DAAO	D-aminoacid oxidase
D-AP5	(R)-2-amino-5-phosphonopentanoat
dATP	desoxy Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy Guanintriphosphat
dTTP	desoxy Tymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRD 3	Dopamin 3-Rezeptorgen
DSM- IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association
DTNBP1	Dysbindin
+E5	N-terminaler Kasseteneinschluss
-E5	N-terminaler Kassettenausschluss
EAAT	Exzitatorischer Aminosäuretransporter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPSP	Exzitatorische postsynaptische Potentiale
G	Guanin
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GKAP	Guanylatkinase assoziiertes Protein
GluR	Ionotroper Glutamatrezeptor
Gly	Glycin
G-Protein	Guanin-Nukleotid Bindungsprotein
HCl	Salzsäure

Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis

5-HT₂ - Rezeptor	Serotonin Rezeptortyp
ICD-10	International Classification of Diseases, Klassifikationssystem für Krankheiten in der Weltgesundheitsorganisation
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
KA	Kainat
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton (Molekulargewicht)
M	Molar
Mg²⁺	Magnesium
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MK-801	Dizolcipin, ((+)-5-Methyl-10, 11-Dihydro-5H-Dibenzo (a,d) Cyclohepten-5, 10-Imin)
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Probandenzahl
N-Terminus	Amino- Ende
NfκB	Nuclear Factor κB
NFL	Neurofilament Leichtkette
(NH₄)₂SO₄	Ammoniumsulfat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
nNOS	Neuronale Stickoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NR1	NMDA Rezeptoruntereinheit 1
NR1 +E5/-E5	Spleißvarianten der NR1 Untereinheit mit und ohne Exon 5 Einschluss
NR2A – NR2D	NMDA Rezeptoruntereinheiten NR2A–NR2D
NR3A-NR3B	NMDA Rezeptoruntereinheiten NR3A–NR3B
NRG 1	Neuregulin 1
p	Signifikanz, p-Wert
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFC	Präfrontaler Cortex
PKC	Proteinkinase C
pmol	Picomol
PP1	Proteinphosphatase 1
Primer	DNA-Oligonukleotid
PSD	Postsynaptische Dichte

Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis

RGS 4	Regulator of G-Protein signaling 4
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
SD	Standardabweichung
Second messenger	Intrazelluläre Botenstoffe
SKID I	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I
SKID II	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse II
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SP-Faktor	Specificity-Faktor
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSCA	Einzelstrang-Konformationsanalyse
T	Thymin
Taq	Thermostabile Polymerase
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
vGluT	Vesikulärer Glutamat-Transporter
ZNS	Zentralnervensystem
λ (lambda)	Wellenlänge

8 Literaturverzeichnis

Abi-Saab WM, D'Souza DC, Moghaddam B, Krystal JH (1998) The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl 2):104-109.

Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445–451.

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of NMDAR2 receptor mRNA in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347 (1):150–60.

Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jones EG (1996) Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenia. *J Neurosci* 16:19-30.

Aamont SM, Constantine-Paton M (1999) The role of neuronal activity in synaptic development and its implications for adult brain function. *Advances in Neurology* 79: 133–44.

Andreasen NC and Olsen S (1982) Negative versus positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry* 39 (7):789-794.

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJA, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-589.

Anson LC, Schoepfer R, Colquhoun D, Wyllie DJ (2000) Single-channel analysis of an NMDA receptor possessing a mutation in the region of the glutamate binding site. *J Physiol (Lond)* 527:225-237.

Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757–765.

Austin J, Hoogendoorn B, Buckland P, Speight G, Cardno A, Bowen T, Williams N, Spurlock G, Sanders R, Jones L, Murphy K, McCarthy G, McGuffin P, Owen MJ, O'Donovan MC (2000) Comparative sequencing of the of the proneurotensin gene and association studies in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 5:1133-40.

Badner JA, Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:405-411.

Bai G, Zhuang Z, Liu A, Chai Y, Hoffman PW (2003) Functional Analysis of the Proximal 5'-Flanking Region of the N-Methyl-d -aspartate Receptor Subunit Gene, NMDAR1. *J Neurochem.* 86:992-1005.

Bailer U, Leisch F, Meszaros K, Lenzinger E, Willinger U, Strobl R, Gebhart C, Gerhard E, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Hornik K, Aschauer HN (2000) Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology* 42:175-182.

Begni S, Moraschi S, bignotti S, Fumagalli F, Rillosi L, Perez J, Gennarelli M (2003) Assotiation between the G1001C polymorphism in the Grin 1 gene promotor region and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53:617-619.

Bender MA, Preston RJ, Loenard RC, Pyatt BE, Gooch PC (1989) Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peropheral blood lymphocytes of a large population sample, II. Extension of age range. *Mutation Res* 212:149-154.

Benes FM, Vincent SL, Alsterberg G, Bird ED, SanGiovanni JP (1992) Increased GABAA receptor binding in superficial layers of cingulated cortex in schizophrenics. *J Neurosci.* 12(3):924-929.

Literaturverzeichnis

Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ (2001) Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* 276:24232-24241

Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J (2001) Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188:143-160.

Bleuler F (1911) Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. In: Aschaffenburg G (Hrsg) d

Braus DF (2005) Schizophrenie. Schattauer Stuttgart New York 2005

Brenman J, Christopherson K, Craven S, McGee A, Bredt D (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16:7407–7415.

Brewer GJ, Cotman CW (1989) NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 99:268-273.

Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, Yolken RH (2001) Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Arch Gen Psychiatry* 58(11):1032-7.

Buller AM, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrisett RA, Monaghan DT (1994) The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 14:5471-5484.

Cahn W, Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS (2002) Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 59:1002-10.

Cannon M, Cotter D, Coffey VP, Sham PC, Takei N, Larkin C, Murray RM, O'Callaghan E (1996) Prenatal exposure to the 1957 influenza epidemic and adult schizophrenia. A follow-up study. *Br J Psychiatry* 168:368-71.

Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, and Koskenvuo M (1998) The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry* 55 (1):67-74.

Cardno, A.G., Marshall, E.J., Coid, B., Macdonald, A.M., Ribchester, T.R. et al. (1999) Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 56:162-168.

Carlsson A (1967) Neurohumoral transmission and neuropsychiatric disorders. *Int J Psychiatry* 4:218-219.

Carlsson A, Lindqvist M (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 20:140-144.

Carlsson AL, Hansson N, Waters M, Carlsson ML (1997) Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sciences* 61:75-94.

Carlsson AL, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:237-260.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cul J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 413:793-798.

Chen Ch, Chiu YL, Shaw CK, Tsai MT, Hwang AL, Hsiao HJ (1999) Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in schizophrenic patients and mental health workers. *Mol Psychiatry* Nov: 4(6):566-71.

Cho YM, Ritchi MD, Moore JH (2004) Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47:549-554.

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bouguelleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P (2002) Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13675–13680.

Ciabarra Am, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 10:6498-6508.

Clements JA, Westbrook GL (1991) Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7, 605-613.

Clinton SM, Meador-Woodruff JH (2004a) Abnormalities of the NMDA receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 29:1353-1362.

Clinton SM, Meador-Woodruff JH (2004b) Thalamic dysfunction in schizophrenia: neurochemical, neuropathological, and in vivo imaging abnormalities. *Schizophr Res* 69:237-253.

Clinton SM, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2003) Altered transcript expression of NMDA receptor-associated postsynaptic proteins in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160:1100-1109.

Cloninger CR (2002) The discovery of susceptibility genes for mental disorders. *Proceedings of the Nat Acad Sci USA* 99:13365-13367.

Colombo C, Bonfanti A, Livian S, Abbruzzese M, Scarone S (1993) Size of the corpus callosum and auditory comprehension in schizophrenics and normal controls. *Schizophr Res* 11:63-70.

Cotman CW, DT Monaghan, OP Ottersen, J Storm-Mathisen (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS* 10:273-280.

Coyle JT, Tsai G (2004) NMDA receptor function, neuroplasticity, and the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 59:491-515.

Crocq MA, Mant R, Asherson P, Williams J, Hode Y, Mayerova A, Collier D, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC (1992) Association between Schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J Med Genet.* 29:858-860.

Crow TJ (1980) Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry* 137:383-386.

Cull-Candy S, Brickley S, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M (1998) NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 37:1369-1380.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.

Dalman C, Allebeck P, Cullberg J, Grunewald C, Koster M (1999) Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort. *Arch Gen Psychiatry* 56(3):234-40.

Dalman C, Thomas HV, David AS, Gentz J, Lewis G, Allebeck P (2001) Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia. Population-based case-control study. *Br J Psychiatry* 179: 403-8.

Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and NMDA receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.

Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377–381.

Davis KL, Kahn RS, Grant K, Davidson M (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148:1474-1486.

De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F (2001) Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* 22:114– 120.

Deister A, Marneros A (1992) Course of schizophrenic disorders in regard to positive and negative symptomatology. In: Ferrero FP, Haynal Appendektomie, Sartorius H (eds). *Schizophrenia and Affektive Psychosen Nosology in Contemporary Psychiatry*. John Libbey, Rom.

Deister A, Marneros A (1993) Long-term stability of subtypes in schizophrenic disorders: a comparison of four diagnostic systems. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 242:184-90.

Dickerson FB, Boronow JJ, Stallings C, Origoni AE, Ruslanova I, Yolken RH (2003) Association of serum antibodies to herpes simplex virus 1 with cognitive deficits in individuals with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* May; 60(5):466-72.

Diefendorf AR (1902) *Clinical Psychiatry, a Text-Book for Students and Physicians* Abstracted and Adapted from the Sixth German Edition of Kraepelin's 'Lehrbuch der Psychiatrie'. New York: Macmillan.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS (1995) The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 26:437– 446.

Dracheva S, Marras SA, Elhaken SL, Kramer FR, Davis KL, Haroutunian V (2001) N-Methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1400-1410.

Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB (1999) Biochemical Studies of the Structure and Function of NMDA subtype of glutamate receptors. *Molecular Neurobiology* 19:151–79.

Durand GM, Bennett VL, Zukin RS (1993) Splice variants of NMDAR1 identify domains involved in regulation by polyamines and PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6731–35.

Ehlers M, Zhang S, Bernhardt J, Huganir R (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745–755.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23: 80–88.

Ferszt R, Severus E, Bode L, Brehm M, Kuhl K-P, Berewski H, Ludwig H (1999) Activated Borna disease virus in affective disorders. *Pharmacopsychiatry* May: 32(3):93-8.

Frank E (1997) Synapse elimination: for nerves it's all or nothing. *Science* 275:324–325.

Franzek E, Beckmann H (1996) Genetic heterogeneity of schizophrenia. Results of a systematic twin study. *Nervenarzt* 67 (7):583-594.

Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecular recruitment. *Neuron* 27:57– 69.

Fukumaki Y, Shibata H (2003) Glutamate Receptor Genes as Candidates for Schizophrenia Susceptibility. *Drug Development Research* 60:137-151.

Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR (1998) Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65 :446– 453.

Glantz LA und Lewis DA (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65–73.

Goebel DJ, Poosch MS (1999) NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69:164-170.

Goff DC, Coyle JT (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1367– 137.

Goff DC, Wine L, (1997) Glutamate in Schizophrenia: clinical and research implications. *Schizophr Res* 27, 157-168.

Goldberg TE, Straub RE, Callicott JH, Hariri A, Mattay VS, Bigelow L, Coppola R, Egan MF, Weinberger DR (2004) The G72/G30 gene complex and cognitive abnormalities in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004 in press.

Gomperts SN, Rao A, Craig AM, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptically silent synapses in single neuron cultures. *Neuron* 21:1443– 1451.

Gottesmann II, Erlenmeyer-Kimling L (2001) Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr Res* 51: 93-102.

Grimwood S, Slater P, Deakin JFW (1999) NR2B-containing NMDA receptors are up-regulated in temporal cortex in schizophrenia. *NeuroReport* 10.461-465.

Grossman MH, Littrel JB, Weinstein R, Szumlanski C, Weinshilboum R (1992) Identification of the possible basis for inherited differences in human catechol-O-methyltransferase. *Trans Neurosci Soc* 18:70-75.

Haas K, (2000) Prefabrication provides synapses on demand. *Trends Neurosci* 23, 449.

Häfner H (1995) Häfner H (Hrsg) Was ist Schizophrenie? Fischer, Stuttgart Jena New York, S 1-56.

Häfner H, Maurer K, Löffler W, Richer-Rössler A (1993) The influence of age and sex on the onset and early course of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 12:80-86.

Häfner H (1993b) What is schizophrenia? *Neurology, Psychopharmacology and Brain Research* 2:36-52.

Häfner A, Riecher A, Maurer K, Munk-Jørgensen P, Strömberg E (1991) Geschlechtsunterschiede bei schizophrenen Erkrankungen. *Fortschr Neurol Psychiatr* 59:343-360.

Hall D, Gogos JA, Karayiorgou M (2004) The contribution of three strong candidate schizophrenia susceptibility genes in demographically distinct populations. *Genes, Brain and Behavior* 3:240-248.

Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai KM (2003) Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2003 Jun; 60(6):572-576.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990) Telomere reduction in colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868.

Hayashi S, Watanabe J, and Kawajiri K (1991) Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem (Tokyo)* 110 (4):559-565.

Hietala J, Syvalahti E, Vuorio K, Nagren k, Lehtikoinen P, Ruotsalainen U, Rakkolainen V, Lehtinen V, Wegelius U (1994) Striatial D2 dopamine receptor characteristics in neuroleptic-naive schizophrenic patients studied with positron emission tomography. *Arch Gen Psychiatry* 51:116-123.

Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6031-6036.

Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramato M, Handa H, Makino I, Scheidereit C (1998) Funktional interference of Sp1 and NF κ B through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* 18:1266-1274

Ho BC, Alicata D, Ward J, Moser DJ, O'Leary DS, Arndt S, Andreasen NC (2003) Untreated initial psychosis: relation to cognitive deficits and brain morphology in first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160:142-8.

Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants on the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.

Hollmann M und Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.

Hung CC, Chen HY and Chen CH (2002) Systematic mutation analysis of the human glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 1 gene (Grin1) in schizophrenic patients. *Psychiatric Genetics* 12:225-230.

Huttenlocher P (1984) Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic* 88:488– 496.

Hwu HG, Lin MW, Lee PC, Lee SF, Ou-Yang WC, Liu CM (2000) Evaluation of linkage markers on chromosome 6p with schizophrenia in Taiwanese families. *Am J Med Genet* 96:74-78.

Ibrahim HM, Hogg AJ, Healy DJ, Harountunian V, Davis KL, Meadoe-Woodruff JH (2000) Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:1811-1823.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M (1992) Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett* 313:34-38.

Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, Ishida T, Nonomura Y, Kono Y, Takahata R (1996) Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet* 67:103-105.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.

Iwahashi K, Watanabe M, Nakamura K, Suwaki H, Nakaya T, Nakamura Y, Takahashi H, Ikuta K (1997) Clinical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan. *Acta Psychiatr Scand*. 1997 Dec; 96(6):412-5.

Izumoto Y, Inoue S, Yasuda N (1999) schizophrenia and the influenza epidemics of 1957 in Japan. *Biol Psychiatry* 46:119-24.

Jablensky A und Cole SW (1997) Is the earlier age at onset of schizophrenia in males a confounded finding? Results from a cross-cultural investigation. *Br J Psychiatry* 170:234-240.

James AC, Javaloyes A, James S, Smith DM (2002) Evidence for non-progressive changes in adolescent-onset schizophrenia: follow-up magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* 180:339-44.

Literaturverzeichnis

Javitt D, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148:1301-1308.

Kapur S, Remington G, Jones C, Wilson A, DaSilva J, Houle S, Zipursky R (1996) High levels of dopamine D2 receptor occupancy with low-dose haloperidol treatment: a PET study. *Am J Psychiatry* 153:948-950

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA (1995) Stimulation of Ionotropic Glutamate Receptors Activates Transcription Factor NF- κ B in Primary Neurons *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9618-9622.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA (1994) Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol* 14:3981-3992.

Karp SJ, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S (1993) Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 268:3728-3733.

Kaufmann CA, Suarez B, Malaspina D, Pepple J, Svrakic D, Markel PD (1998) NIMH Genetics Initiative Millenium Schizophrenia Consortium: Linkage analysis of African-American pedigrees. *Am J Med Genet* 81:282-89.

Kay SR, Fiszbein A, Opler LA (1987) The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 13:261-76.

Kendell RE, Kemp IW (1989) Maternal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 46:878-82.

Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK (1994) Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 51 (6):456-468.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK (1994) Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic

adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. Arch Gen Psychiatry 51 (6):442-455.

Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Development changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. J Neurosci 18:1935-1943.

Kew JN, Koester A, Moreau JL, Jenck F, Ouagazzal AM, Mutel V, Richards JG, Trube G, Fischer A, Montkowski A, Hundt W, Reinscheid RK, Pauly-Evers M, Kemp JA, Bluethmann H (2000) Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. J Neurosci 20:4037-4049.

Kilts CD (2001) The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. Biol Psychiatry 50:845-855.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980) Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. Neurosci Lett 20:379–382.

Kirov G, Ivanov D, Williams NM, Preece A, Nikolov I, Milev R, Koleva S, Dimitrova A, Toncheva D, O'Donovan MC, Owen MJ (2004) Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. Biol Psychiatry 55:971–975.

Konradi C, Heckers S (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. Pharmacol Ther 97(2):153-79.

Kornhuber J, Weller M (1994) Aktueller Stand der biochemischen Hypothesen zur Pathogenese der Schizophrenie. Nervenarzt 65:741-754

Kraepelin E (1896) Dementia praecox. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, 5. Auflage ed. Leipzig: Barth.

Kunugi H, Nanko S, Murray RM (2001) Obstetric complications and schizophrenia: prenatal underdevelopment and subsequent neurodevelopmental impairment. *Br J Psychiatry* 178(Suppl 40):25-29.

Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M (1992) Molecular diversity of NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.

Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDa receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1079-1086.

Lachmann HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski C, Weinshilboum R (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6:243-250.

Lau L, Mammen A, Ehlers M, Kindler S, Chung W, Garner C, Huganir R (1996) Interaction of the N-methyl-D-aspartate receptor complex with a novel synapse-associated protein, SAP102. *J Biol Chem* 271:21622–21628.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDa receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.

Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.

Laurie DJ und Seeburg PH (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl- D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* 268:335-345.

Lee SH und Sheng M (2000) Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol* 10:125–131.

Leweke FM, Gerth CW, Koethe D, Klosterkötter J, Ruslanova I, Krivogorsky B, Torrey EF, Yolken RH (2004) Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254(1):4-8.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LH, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *AM J Hum Genet* 73:34-48.

Li T, Ball D, Zhao J, Murray RM, Liu X, Sham PC, Collier DA (2000) Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Mol Psychiatry* 5:77-84.

Li L, He S, Sun JM, Davie JR (2004) Gene Regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82:460-471.

Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-404.

Limosin F, Rouillion F, Payan C, Cohen JM, Strub N (2003) Prenatal exposure to influenza as a risk factor for adult schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 107:331-5.

Lindholm E, Ekholm B, Balciuniene J, Johansson G, Castensson A, Koisti M, Nylander PO, Pettersson U, Adolfsson R, Jazin E (1999) Linkage analysis of a large Swedish kindred provides further support for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6p23. *Am J Med Genet* 88:369-377.

Lipton SA (1997) Janus faces of NF- κ B: Neurodestruction versus neuroprotection. *Nat Med* 3:20-22.

Liu A, Hoffman PW, Lu W, Bai G (2004) NF-kappa-B Site Interacts with Sp Factors and Up-regulates the NR1 Promotor during Neuronal Differentiation. *J Biol Chem* 279:17449-17458.

Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021-1024.

Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34:4202-4210.

Löffler G, Petrides PE (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. korrigierte Auflage-Springer –Verlag Berlin Heidelberg.

Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum F, Gottlieb J, Kelly R (1959) Study of a new Schizophrenomimetic drug, Sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81:363-369.

Martinot JL, Peron-Magnan P, Huret JD, Mazoyer B, Baron JC, Boulenger JP, Loc'h C, Maziere B, Caillard V, Loo H (1990) Striatal D2 dopaminergic receptors assessed with positron emission tomography and Br-bromospiperone in untreated schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 147:44-50.

McDonald J, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research reviews* 15:41-70.

McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE (1995) Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* 346 (8976):678-682.

Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101.

Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, Schwab S (1999) Genetics of schizophrenic disorders. New concepts and findings. *Nervenarzt* 70:955-969.

Marneros A, Deister A, Rhode A (1991) *Akffektive, schizoaffektive und schizophrene Psychosen. Eine vergleichende Langzeitstudie*. Springer, Berlin

Marneros A, Rhode A, Deister A. (1995) Validity of the negative/positive dichotomy of schizophrenic disorders under long-term conditions. *Psychopathology* 28:32-37.

Martucci L, Wong AHC, Tracalo J, Cate-Carter T, Wong GWH, Macciardi FM, and Kennedy JL (2003) N-Methyl-D-Aspartate Receptor NR1 Subunit Gene (GRIN1) in Schizophrenia: TDT and Case-Control Analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B* 119B:24-27.

Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola F (2000) Roles of Nuclear Factor κ B in Neuronal Survival and Plasticity. *J Neurochem* 74:443-456.

Matsuda M, Sakamoto N, and Fukumaki Y (1992) Delta-thalassemia caused by disruption of the site for an erythroid-specific transcription factor, GATA-1, in the delta-globin gene promoter. *Blood* 80 (5):1347-1351.

Maurer K, Häfner H (1995) Epidemiologie positiver und negativer Symptome in der Schizophrenie. In: Häfner H (Hrsg.) *Was ist Schizophrenie?* Fischer, Stuttgart Jena New York

Maziade M, Roy MA, Rouillard E, Bissonnette L, Fournier JP, Roy A, Garneau Y, Montgrain N, Potvin A, Cliche D, Dion C, Wallot H, Fournier A, Nicole L, Lavallee JC, Merette C (2001) A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder. A linkage study in 13 target chromosomes. *Mol Psychiatry* 6:684-693.

McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE (1995) Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* 346 (8976):678-682.

Meador-Woodruff JH, Clinton SM, Beneyto M, McCullumsmith RE (2003) Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus of schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 1003:75-93.

Meador-Woodruff JH, Healy DJ (2000) Glutamate receptor expression in schizophrenia brain. *Brain Res Interactive* 31:288-294.

Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D (1988) Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry* 45:189-92

Meltzer HY (1997) Treatment-resistant schizophrenia- the role of clozapine. *Curr Med. Res. Opin* 14(1): 1-20.

Millan MJ (2002) NMDA receptor-coupled Glycine B receptors in the pathogenesis and treatment of schizophrenia: a critical review. *Curr Drug Targets* 1:191-213.

Mino Y, Oshima I, Tsuda T, Okagami K (2000) No relationship between schizophrenic birth and influenza epidemics in Japan. *J Psychiatr Res* 34:133-8.

Moldin SO (1997) The maddening hunt for madness genes. *Nat Genet* 17:127-129.

Momiyama A, Feldmeyer D, Cull-Candy SG (1996) Identification of a native low-conductance NMDA channel with reduced sensitivity to Mg²⁺ in rat central neurones. *J Physiol (Lond)* 494:479-492.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakman B, Seeburg PH (1994) Development and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA Receptors. *Neuron* 12:529-40.

Moore JH, Williams SM (2002) New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann Med* 34:88-95.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterisation of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.

Morris DW, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP (2003) No evidence for association of the dysbindin gene (DTNBP1) with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr Res* 60: 167–172.

Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady Jr RO, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SA (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (9):4926-4931.

Murase S und Schuman EM (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 11:549– 553.

Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.

Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev.* 26:230-235.

Newton CR, Graham A (1994) PCR: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford

Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.

O`Callaghan E, Sham P, Takei N, Glover G, Murray RM (1991) Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *Lancet* 337:1248-50.

O`Donovan MC, Owen MJ (1999) Candidate-gene association studies of schizophrenia. *Am J Hum Genet* 65:587-592.

Olney JW, Farber NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52:998– 1007.

Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA (1991) NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254:1515–1518.

Onstad S, Skre I, Torgersen S, Kringlen E (1991) Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 83 (5):395-401.

Owen MJ, Cardno AG, O'Donovan MC (2000) Psychiatric genetics: back to the future. *Mol Psychiatry* 5:22-31.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.

Paus S, Rietschel M, Schulze TG, Ohlraun S, Diaconu CC, Van den Bogaert A, Maier W, Propping P, Cichon S, Nöthen MM (2004) Systematic screening for mutations in the human N-methyl-D-aspartate receptor 1 gene in schizophrenic patients from the German population. *Psychiatric Genetics* 14:233-234.

Pellicciari R, Costantino G (1999) Metabotropic G-protein-coupled glutamate receptors as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol* 3:433– 440.

Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228-1237.

Popken GJ, Leggio MG (2002) Expression of mRNAs related to the GABAergic and glutamatergic neurotransmitter systems in the human thalamus: normal and schizophrenic. *Thalamus Relat Syst* 1:349-369.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 48:841-848.

Qiagen (ed.) (2001) DNA Blood Midi Kit and DNA Blood Maxi Kit Handbook.

Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, Bao J, Zhang Z, He L (2005) An association Study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (Grin1) and NR2B subunit gene (Grin2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *Europ J Human Genet* 13(7):807-814.

Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1998) Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 55(3):215-24.

Rice SR, Niu N, Berman DB, Heston LL, Sobell JL (2001) Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other sequence changes and estimation of nucleotide diversity in coding and flanking regions of the NMDAR1 receptor gene in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 6:274-284.

Riley BP, Tahir E, Rajagopalan S, Mogudi-Carter M, Faure S, Weissenbach J (1997) A linkage study of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene loci and schizophrenia in southern African Bantu-speaking families. *Psychiatr Genet* 7:57-74.

Ritchi MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH (2001) Multifactor–dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 69(1):138-147.

Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.

Rüdin E (1916) Studien über Vererbung und Entstehung geistiger Störungen. I. Zur Vererbung und Entstehung der Dementia praecox. Berlin: Springer, 1916.

Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Möller H-J, Grunze H (2006) A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioural abnormalities. *Biol Psychiatry* 59:721-729.

Safferling M, Tichelaar W, Kummerle G, Joupilla A., Kuusinen A, Keinänen K, Madden DR (2001) First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers. *Biochemistry* 40:13948-13953.

Sakurai K, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T (2000) Mutation analysis of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (Grin1) in schizophrenia. *Neurosci Letters* 296:168-170.

Sambook J (1989) Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol. 2. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Chan SF, Zhang H, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.

Schiffer HH (2002) Glutamate receptor genes. *Mol Neurobiol* 25:191-212.

Schmauß M (2002) Schizophrenie-Pathogenese, Diagnostik und Therapie. 1.Auflage-Bremen: UNI-MED.

Schumacher J, Abon Jamra R, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Van Den Bogaert A, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S (2004) Examination of G72 and D-aminoacid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9: 203–207 between the COMT locus and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 9:183–186.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72: 185–190.

Literaturverzeichnis

Selemon L D und Goldman-Rakic PS (1999) The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:17–25.

Selten JP, Slaets JP (1994) Evidence against maternal influenza as a risk factor for schizophrenia. *Br J Psychiatry* 164:674-6.

Sheinin A, Shavit S, Benveniste M (2001) Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacology* 41:151-158.

Sheng M, Cummings J, Roldan L, Jan Y, Jan L (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144–147.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp I, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Knobler HY, Shinar E, Zak NB, Darvasi A (2002) A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(6):1296-1302.

Smith JD, Brinton EA, Breslow JL (1992) Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest* 89 (6):1796-1800.

Smith RE, Haroutunian V (2001a) Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1393-1399.

Smith RE, Haroutunian V (2001b) Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia. *Neuro-Report* 12:1-3.

Snyder SH (1981) Dopamine receptors, neuroleptics, and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 138(4):460-464.

Spurlock G, Heils A, Holmans P, Williams J, D'Souza UM, Cardno A, Murphy KC, Jones L, Buckland PR, McGuffin P, Lesch KP, Owen MJ (1998) A family based association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promotor. *Mol Psychiatry* 3(1):42-49.

Straub RE, Jing Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71: 337-348.

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.

Suske G (1999) The Sp-Family of transcription factors. *Gene* 238:291-300.

Tang JX, Zhou J, Fan JB, Li XW, Shi YY, Gu NF, FengGY, Xing YL, Shi JG, He L (2003) Family-based association study of DTNBP1 in 6p22.3 and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:717-718.

Tani A, Kikuta R, Itoh K, Joo A, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N and Fukumaki Y (2002) Polymorphism analysis of the upstream region of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (Grin1): implications for schizophrenia. *Schizophrenia Research* 58:83-86.

Tingley W, Roche K, Thompson A, Huganir R (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364:70-73.

Tingley WG, Ehlers D, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Huganir RL (1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor NR1 subunit using. *J Biol Chem* 272 (8):5157-66.

Thompson PM, Vidal C, Giedd JN, Gochman P, Blumenthal j, Nicolson R, Toga AW, Rapoport JL (2001) Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11650-5.

Torrey EF, Bowler AE (1990) The seasonality of schizophrenic births: a reply to Marc S. Lewis. *Schizophr Bull* 16 (1):1-3.

Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, BartkoJJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB (2005) Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in post-mortem brains. *Biol Psych* 57:252-260.

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268:873-876.

Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* 18:6163-6175.

Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Thari N, Golmard JL, Tired I, Cambien F, (2002) Specific haplotypes of the p-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 11:2015-2023.

Tsai CT, Lai LP, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Ritchi MD, Moore JH, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ (2004) Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation* 109(13):1640-1646.

Tsuang MT, Stone WS, and Faraone SV (2001) Genes, environment and Schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 40:18-24.

Tsuang MT, Tohen M, Zahner GEP (1995) Textbook in Psychiatry epidemiology. New York: Wiley-Liss.

Van Berckel BN (2003) Glutamate and schizophrenia. *Curr Neuropharmacol* 1:351-370.

Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S

(2003) The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *Am J Hum Genet* 73:1438–1443.

Van den Oord EJ, Sullivan PF, Jiang Y, Walsh D, O'Neill FA, Kendler KS, Riley BP (2003) Identification of a high-risk haplotype for the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene in the Irish study of high-density schizophrenia families. *Mol Psychiatry* 8:499–510.

Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Funktional and pharmalogical differences between recombinant NMDA receptors. *J Neurophysiol* 79:555-566.

Wang X, Guang H, Niufan G, Jiandong Y, Junxia T, Qi C, Xinmin L, Yifeng S, Xueqing Q, Wei I, Yun D, Guoyin F, Lin H (2004) Assiciation of G72/G30 with schizophrenia in the Chinese population. *Biochem and Biophys Res Comm* 319:1281-1284.

Watson CG, Kucala T, Tilleskjor C, Jacobs L (1984) Schizophrenic birth seasonality in relation to the incidence of infectious diseases and temperature extremes. *Arch Gen Psychiatry* 41:85-90.

Wenzel A, Scheurer L, Künzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1995) Distribution of NMDANR2A 2B 2C 2D in rat brain. *Neuroreport* 7:45–48.

Williams J, Spurlock G, Mc Guffin P (1996) Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet* 347:1294-1296.

Williams J, Spurlock G, Holmans P (1998) A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3:141-149.

Williams NM, Bowen T, Spurlock G, Non N, Williams HJ, Hoogendoorn B, Owen MJ, O'Donovan MC (2002) Determination of the genomic structure and mutation screening in schizophrenic individuals for five subunits of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Mol Psychiatry* 7:508-514

Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, Norton N, Williams H, Clement M, Dwyer S, Curran S, Wilkinson J (2004) Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1). *Arch Gen Psychiatry* 61: 336–344.

Wong WT, Wong RO (2000) Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr Opin Neurobiol* 10:118– 124.

Wong DF, Wagner HN Jr, Tune LE, Dannals RF, Pearlson GD, Links JM, Tamminga CA, Broussolle EP, Ravert HAT, Wilson AA (1986) Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naïve schizophrenics. *Science* 234:1558-1563.

Woo TUW, Walsh JP, Benes FM (2004) Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-Methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 61:649-657.

Woods BT (1998) Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry* 155:1661-70.

Wu G, Malinow R, Cline HT (1996) Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274:972–976.

Wyllie DJ, Behe P, Colquhoun D (1998) Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J Physiol (Lond)* 510:1-18.

Yamakura T, Shimoh K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.

Yolken R (2004) Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus. *Herpes* 11 Suppl 2:83A-88A.

Zang ZJ, Reynolds GP (2002) A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 55:1-10.

Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L, Liu H, He L (2006) Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene *Grin1* and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:747-753.

Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J (1995) Cloning and strukture of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 159:219-223.

Zukin R, Bennett M (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDA-receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306–313.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Möller danke ich für das Entgegenkommen, dass ich diese Arbeit in der von Ihm geleiteten Psychiatrischen Universitätsklinik absolvieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dan Rujescu für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe. Er war stets ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mich in meinem Interesse an dem faszinierenden Gebiet der molekularen Neurobiologie bestärkt und gefördert hat.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Diplompsychologin Ina Giegling bedanken, deren Unterstützung bei der statistischen Auswertung für meine Ergebnisse unerlässlich war.

Eine große Hilfe für meine Arbeit war Frau Dr. humanbiol. Annette Hartmann. Ich möchte ihr in diesem Rahmen ganz herzlich danken für ihre kompetente Unterstützung bei der Laborarbeit und die hilfreichen Anregungen im Rahmen der Korrektur.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Mitarbeiter des Labors, die mit ihrer guten Laune und tatkräftigen Unterstützung für Spaß an der Arbeit sorgten: Claudia Gonnermann, Daniela Glatz, Frank Berendt, Anton Gietl und Rudi Sperber.

Mein Dank richtet sich auch an alle Probanden, die sich für diese Studie als Teilnehmer zur Verfügung gestellt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Julian Kalasch
Geburtsdatum / Ort: 30.12.1977 in München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Adresse: Petersenstr. 22, 81477 München

Ausbildung:

Schule: 1997
Abitur am Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing

Wehrdienst: 1997 – 1998
Sanitätsdienst\ Bundeswehrapotheke München

Studium: 1998 – 2004
Studium der Zahnmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
(Staatsexamen im September 2004)

2004
Approbation als Zahnarzt

seit 2002
Promotion in der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Berufserfahrung:

2004-2006
Assistenzzahnarzt in der Praxis Dr. Härtel in München

Seit 2007
Zahnarzt in der Praxis Dr. Zacher in Hohenschäftlarn